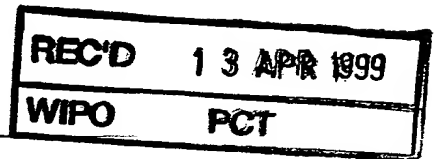




CT/FR 99 / 0 0 7 4 0

**BREVET D'INVENTION****09/647678****CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE****PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **19 JAN. 1999**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

030740120

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

<p>DATE DE REMISE DES PIÈCES 02 AVR 1998</p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 98 04121 -</p> <p>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75</p> <p>DATE DE DÉPÔT 02 AVR. 1998</p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>RHONE-POULENC RORER S.A. Direction Brevets 20 avenue Raymond aron 92165 ANTONY CEDEX</p>									
<p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p><input type="checkbox"/> demande initiale</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°</p>		<p>n° du pouvoir permanent 7/08/1997 références du correspondant ST98009 téléphone 01 55 71 73 26</p> <p>date</p>									
<p>Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non</p> <p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p>NOUVEAUX AGENTS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES, COMPOSITIONS LES CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS.</p>											
<p>3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 3.0.4.4.6.3.2.8.4 code APE-NAF</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p>RHONE-POULENC RORER S.A.</p>		<p>Forme juridique</p>									
<p>Nationalité (s) Française</p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p>20 avenue Raymond Aron 92160 ANTONY</p>		<p>Pays</p> <p>FRANCE</p>									
<p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p>											
<p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission</p>											
<p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
<p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date</p>											
<p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR RHONE-POULENC RORER S.A. (nom et qualité du signataire) Fondateur NIEDERST Claire</p>		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION [Signature]</p> <p>SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI [Signature]</p>									

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 04 121

ST98009

TITRE DE L'INVENTION :

**NOUVEAUX AGENTS DE TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES, COMPOSITIONS LES
CONTENANT ET LEURS APPLICATIONS.**

LE (S) SOUSSIGNÉ (S)

RHONE-POULENC RORER S.A.
20 avenue Raymond Aron
92160 ANTONY

DÉSIGNE (NT) EN TANT QU'INVENTEUR (S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- BYK Gérardo

8 rue Edmond De Goncourt
94000 CRETEIL (FRANCE)

- FREDERIC Marc

32 rue Denis Papin
91220 BRETIGNY SUR ORGE (FRANCE)

- HOFLAND Hans

1439 Terra Nova Boulevard
Pacifica, CA 94044 (USA)

- SCHERMAN Daniel

10 rue Erard
75012 PARIS (FRANCE)

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Antony, le 30 mars 1998

RHONE-POULENC RORER S.A.
Fondé de Pouvoir


NIEDERST Claire

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
odifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
47,48			α	15-06.98	19 JUIN 1998 - S R

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

COMPOSES, LEUR PREPARATION ET LEUR UTILISATION POUR LE
TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES DANS LES CELLULES

La présente invention concerne de nouveaux agents de transfert d'acides nucléiques dans les cellules. Ces nouveaux agents de transfert d'acides nucléiques sont plus particulièrement apparentés à la famille des lipopolyamines, et comportent au moins une fonction amidine cyclique. Ces agents sont utiles pour la transfection des acides nucléiques dans différents types cellulaires, aussi bien *in vitro* que *ex vivo* ou *in vivo*.

Avec le développement des biotechnologies, la possibilité de transférer efficacement des acides nucléiques dans les cellules est devenue une nécessité. Il peut s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *in vitro*, par exemple pour la production de protéines recombinantes, ou au laboratoire, pour l'étude de la régulation de l'expression de gènes, le clonage de gènes, ou toute autre manipulation impliquant l'ADN. Il peut également s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *in vivo*, par exemple pour la création d'animaux transgéniques, la réalisation de vaccins, des études de marquage ou également des approches thérapeutiques. Il peut encore s'agir du transfert d'acides nucléiques dans des cellules *ex vivo*, dans des approches de greffes de moelle osseuse, d'immunothérapie ou d'autres méthodes impliquant le transfert de gènes dans des cellules prélevées d'un organisme, en vue de leur réadministration ultérieure.

Différents types de vecteurs synthétiques ont été développés pour améliorer le transfert des acides nucléiques dans les cellules. Parmi ces vecteurs, les lipides cationiques possèdent des propriétés intéressantes. Ces vecteurs sont constitués d'une partie polaire, cationique, interagissant avec les acides nucléiques, et d'une partie lipidique, hydrophobe, favorisant la pénétration cellulaire. Des exemples particuliers de lipides cationiques sont notamment les lipides monocationiques (DOTMA : Lipofectin®), certains détergents cationiques (DDAB), les lipopolyamines et en particulier la dioctadécylamidoglycyl spermine (DOGS) ou la 5-carboxyspermylamide de la palmitoylphosphatidylethanolamine (DPPES), dont la préparation a été décrite

par exemple dans la demande de brevet EP 394 111. Une autre famille de lipopolyamines est représentée par les composés RPR120531, RPR 122766 ou RPR120535 décrits dans la demande de brevet WO 97/18185 incorporée à la présente par référence, et sont illustrés à la figure 2.

5 Mais jusqu'à présent, les injections dans les tissus, et notamment les muscles, étaient souvent faites avec de l'ADN nu afin de faciliter son entrée dans les cellules, l'association à des vecteurs synthétiques conduisant à des complexes de taille trop importante pour être incorporés dans les cellules.

C'est un des principaux problèmes que la présente invention se propose de résoudre. En effet, les agents de transfert d'acides nucléiques selon l'invention possèdent l'avantage inattendu de présenter un niveau de transfection in vivo dans le muscle au moins équivalent à celui obtenu avec l'ADN nu. L'association avec un composé selon l'invention protège l'ADN des dégradations par les nucléases et/ou des détériorations au cours de la lyophilisation, ce qui contribue à améliorer significativement la stabilité des formulations nuclolipidiques. De plus, une telle association permet une libération contrôlée lente des acides nucléiques.

Par ailleurs, les agents de transfert d'acides nucléiques selon la présente invention sont des lipides cationiques portant une région cationique originale qui confère aux molécules des propriétés améliorées, et notamment une cytotoxicité réduite par rapport aux vecteurs cationiques de l'art antérieur. Cette partie cationique est représentée plus précisément par une ou plusieurs polyamine particulière(s), portant une ou plusieurs fonctions amidine cycliques.

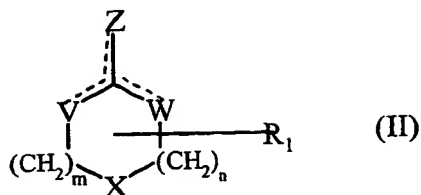
Ainsi, un premier objet de l'invention concerne un nouveau type d'agents de transfert d'acides nucléiques sous forme D, L, ou DL, de formule générale (I) :



25

pour laquelle :

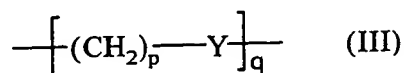
① CA représente une tête cycloamidine et ses formes mésomères de formule générale (II) :



pour laquelle :

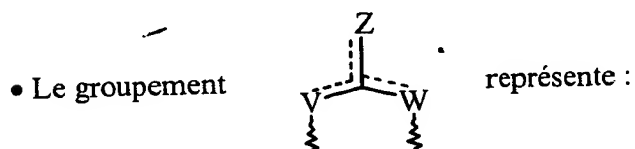
- m, et n sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 3 inclus et tels que m+n est supérieur ou égal à 1,

- 5 • R₁ représente un groupement de formule générale (III) :

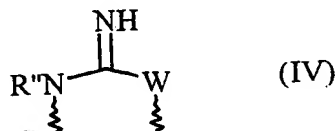


- pour laquelle p et q sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 10 inclus, et Y représente un groupement carbonyle, amine, méthylamine, ou bien méthylène, Y pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements [(CH₂)_p-Y], et étant entendu que R₁ peut être lié à n'importe quel atome de la formule générale (II),

- X représente un groupement NR₂ ou bien CHR₂, R₂ étant soit un atome d'hydrogène soit le groupement R₁ tel que défini précédemment,



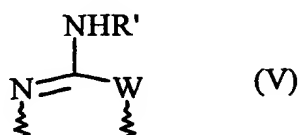
- 15 * 1^{er} cas : un groupement de formule générale (IV) :



pour laquelle W représente CHR''' ou bien NR''', et R'' et R''' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou le groupement

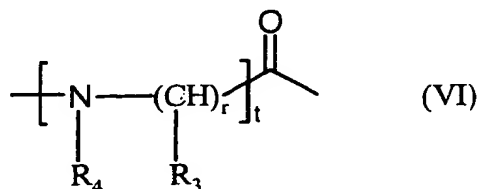
R_1 tel que défini précédemment, étant entendu que R'' et R''' ne peuvent pas être R_1 en même temps, ou bien

* 2^{ème} cas : un groupement de formule générale (V) :



- 5 pour laquelle W représente CHR''' ou bien NR''' , et R' et R''' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou le groupement R_1 tel que défini précédemment, étant entendu que R' et R''' ne peuvent pas être R_1 en même temps,

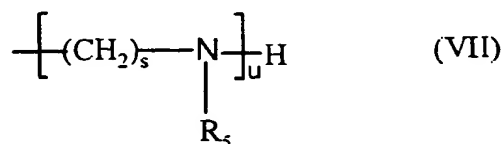
② Rep est absent ou est un répartiteur de formule générale (VI) :



10

dont l'atome d'azote est rattaché à CA, et :

- t est un entier compris entre 0 et 8 inclus,
 - r est un entier compris entre 0 et 10 inclus, r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements $-\text{NR}_4-(\text{CH})_r-$,
- 15 • R_3 , qui peut avoir des significations différentes au sein des différents groupements $\text{NR}_4-(\text{CH})_r\text{R}_3$, représente un atome d'hydrogène, un groupement méthyle, ou un groupement de formule générale (VII) :



pour laquelle u est un entier compris entre 1 et 10 inclus, s est un entier compris entre 2 et 8 inclus pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements $-(CH_2)_s-NR_5$, et R_5 est un atome d'hydrogène, un groupement CA tel que définis précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, ou bien un groupement de formule générale (VII) étant entendu que les groupements de formule générale (VII) sont indépendants les uns des autres et peuvent avoir des significations différentes,

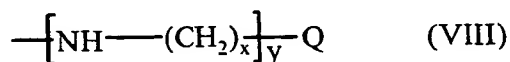
• R_4 est défini de la même façon que R_3 ou bien représente un groupement CA tel que défini précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, et

③ R est lié a la fonction carbonyle du groupement Rep de formule générale (VI), ou bien si Rep est absent R est lié directement à CA, et représente :

* soit un groupement de formule NR_6R_7 pour laquelle R_6 et R_7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique saturé ou non, linéaire ou ramifiée, éventuellement fluoré, contenant 1 à 22 atomes de carbone, avec l'un au moins des deux substituants R_6 ou R_7 différent de l'hydrogène et l'autre contenant entre 10 et 22 atomes de carbone,

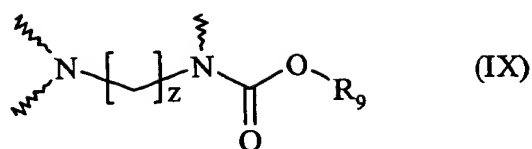
* soit un dérivé de stéroïde,

* soit un groupement de formule générale (VIII) :



20

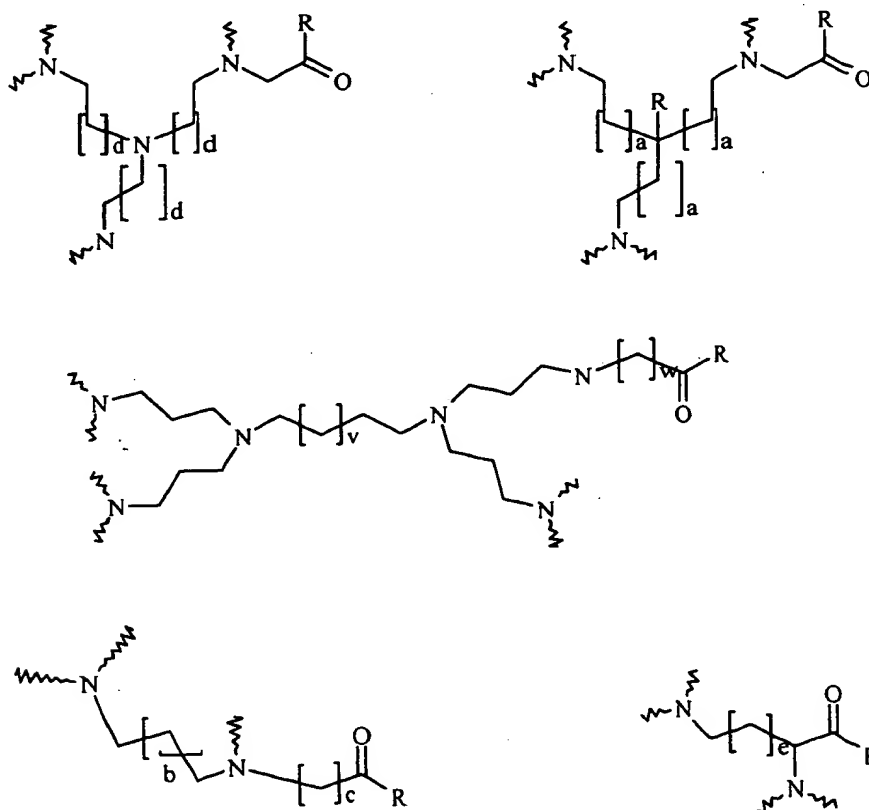
pour laquelle x est un entier compris entre 1 et 8 inclus, y est un entier compris entre 1 et 10 inclus, et soit Q représente un groupement $\text{C}(\text{O})\text{NR}_6\text{R}_7$ pour lequel R_6 et R_7 sont définis comme précédemment, soit Q représente un groupement $\text{C}(\text{O})\text{R}_8$ pour lequel R_8 représente un groupement de formule (IX) :



pour laquelle z est un entier compris entre 2 et 8 inclus, et R_9 est un radical aliphatique saturé ou non, éventuellement fluoré, contenant 8 à 22 atomes de carbone, ou un dérivé de stéroïde,

- 5 ou bien R_8 représente un groupement ---OR_9 pour lequel R_9 est défini comme ci-dessus.

Dans une première variante de l'invention, Rep est un répartiteur à 1, 2, ou 3 bras. On peut par exemple citer les répartiteurs suivants :



Dans une seconde variante de l'invention, R_3 et R_4 , présent dans la formule (VI), représentent des atomes d'hydrogène.

Dans une autre variante de l'invention R_4 est un atome d'hydrogène et R_3 est un groupement de formule (VII) dans laquelle R_5 représente une tête cycloamidine CA.

Avantageusement, la tête cycloamidine CA de formule (II) comporte 5, 6, 7
5 ou 8 chaînons.

Préférentiellement, dans la formule (III), p et q sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi 2, 3 ou 4.

Comme indiqué ci-avant, le groupement R contient au moins une chaîne aliphatique ou au moins un dérivé de stéroïde, c'est à dire plus généralement au moins
10 un segment hydrophobe. On entend au sens de l'invention par groupement hydrophobe tout groupement de type lipidique, favorisant la pénétration cellulaire.

De manière préférentielle, le groupement lipophile est un radical aliphatique contenant 10 à 22 atomes de carbone, de préférence en 12, 14, 16, 17, 18, ou 19 atomes de carbone, et notamment les groupements $(CH_2)_{11}CH_3$, $(CH_2)_{13}CH_3$,
15 $(CH_2)_{15}CH_3$, $(CH_2)_{17}CH_3$, et oléyl (chaîne de 18 atomes de carbone insaturée).

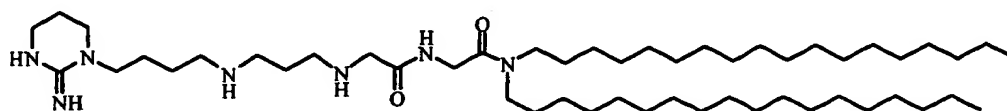
Dans un mode particulier de mise en oeuvre, les groupes R_6 et R_7 sont identiques ou différents et représentent chacun une chaîne aliphatique saturée ou non, linéaire ou ramifiée, éventuellement fluorée, contenant 10 à 22 atomes de carbone.

Lorsque le groupe lipophile est un dérivé de stéroïde, celui-ci est
20 avantageusement choisi parmi le cholestérol, le cholestanol, le 3- α -5-cyclo-5- α -cholestan-6- β -ol, l'acide cholique, le cholestérylformiate, le cholestanylformiate, le 3 α ,5-cyclo-5 α -cholestan-6 β -yl formiate, la cholestérylamine, la 6-(1,5-diméthylhexyl)-3 α ,5 α -diméthyl-
hexadécahydrocyclopenta[a]cyclopropano[2,3]cyclopenta[1,2-f]naphta-lèn-10-ylamine,
25 ou la cholestanylamine.

Ces nouveaux agents de transfert d'acides nucléiques de formule générale (I) peuvent se présenter sous forme de sels non toxiques et pharmaceutiquement

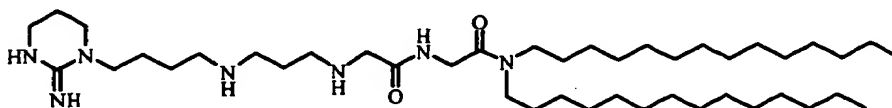
acceptables. Ces sels non toxiques comprennent les sels avec les acides minéraux (acides chlorhydrique, sulfurique, bromhydrique, phosphorique, nitrique) ou avec les acides organiques (acides acétique, propionique, succinique, maléique, hydroxymaléique, benzoïque, fumarique, méthanesulfonique ou oxalique) ou avec les bases minérales (soude, potasse, lithine, chaux) ou encore avec les bases organiques (amines tertiaires comme la triéthylamine, la pipéridine, la benzylamine).

A titre d'exemple illustratif d'agents de transfert d'acides nucléiques avantageux selon l'invention, on peut citer les composés de formules suivantes :



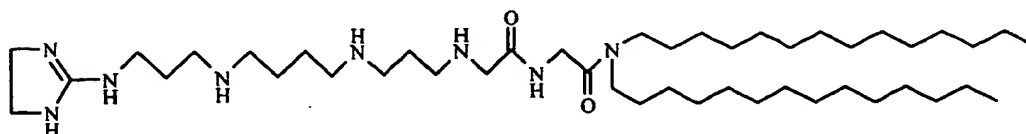
1

N-dioctadécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]propylamino}-acétamide



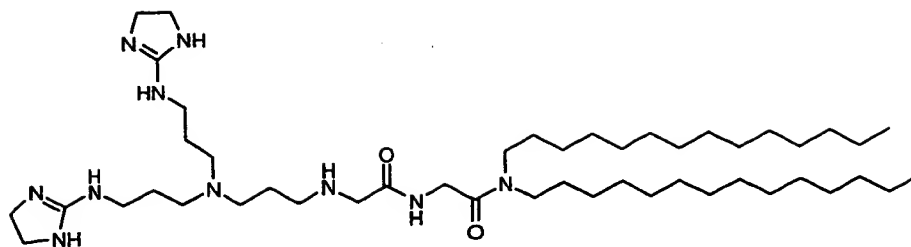
2

N-ditétradécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]propylamino}-acétamide



3

2-(3-{4-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propylamino]-butylamino}-N-ditétradécylcarbamoylméthyl-acétamide



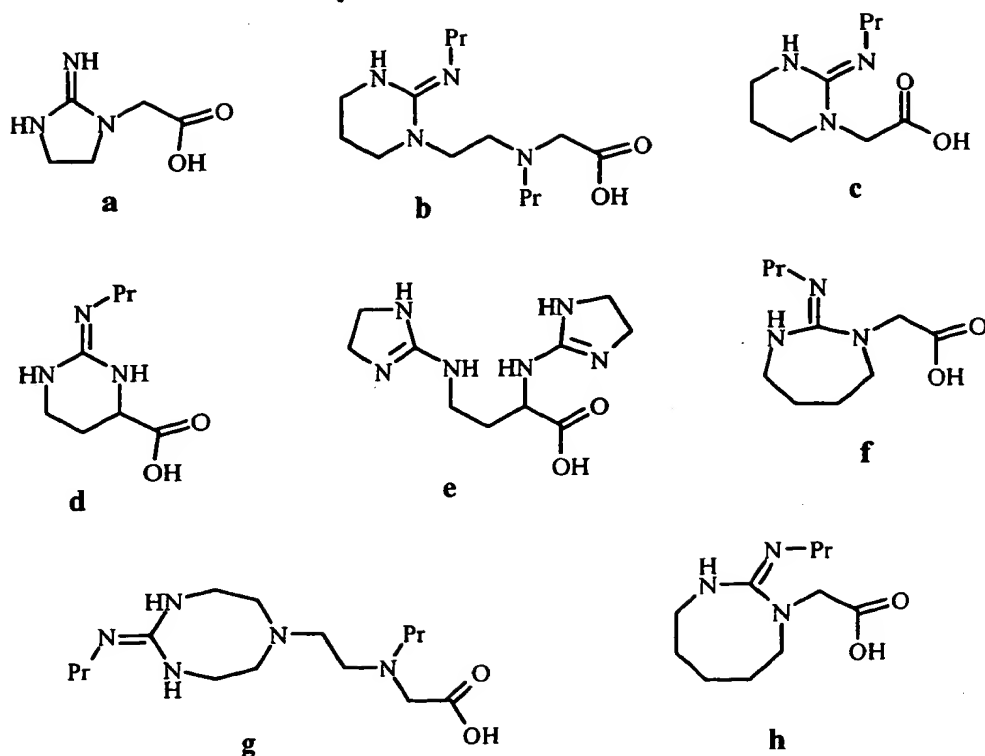
4

2-(3-{bis-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propyl]-amino}-propylamino)-N-ditétradécylcarbamoylméthyl-acétamide.

Les agents de transfert d'acides nucléiques de l'invention peuvent être préparés de différentes façons. Notamment, une première méthode consiste à effectuer une synthèse de "briques" portant la fonction cycloamidine qui sont ensuite greffée(s) sur des lipides équipés de répartiteurs. Cette méthode présente l'avantage d'accéder à un nombre important de produits. Une autre méthode correspond à la synthèse des lipopolyamines, la cyclisation en têtes cycloamidine étant effectuée dans un second temps.

Au sens de l'invention, on entend par "briques" tout segment de molécule fonctionnel. Par exemple, la tête cycloamidine CA telle que définie dans la formule générale (II), Rep ou encore R constituent chacun des briques au sens de l'invention.

Des briques portant la ou les fonctions cycloamidine et qui peuvent être directement couplées sont par exemple :



La cyclisation des têtes amidine selon le second mode de synthèse précédemment décrit peut par exemple être effectuée par réaction entre une et/ou plusieurs amines primaires situées dans une molécule d'intérêt et des réactifs tels que le O-Methylisourea Hydrogen sulfate (Ref: J. Med Chem. 38(1995) 16, 3053-3061) ou le S-Methylisothiourea semisulfate (ref: Int. J. Pept. Prot. Res.40 (1992), 119-126). D'autres méthodes et/ou d'autres réactifs connus de l'homme du métier peuvent bien entendu être utilisés.

Un autre objet de l'invention concerne une composition comprenant un agent de transfert d'acides nucléiques tel que défini ci-avant, et un acide nucléique. Préférentiellement, l'agent de transfert et l'acide nucléique sont présents en quantités telles que le rapport R des charges positives du composé sur les charges négatives de l'acide nucléique soit compris entre 0,1 et 50, de préférence entre 0,1 et 20. Ce rapport peut être ajusté aisément par l'homme du métier en fonction du composé utilisé, de l'acide nucléique, et des applications recherchées (notamment du type de cellules à transfecter).

On entend au sens de l'invention par "acide nucléique" aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences naturelles ou artificielles, et notamment d'ADN génomique (ADNg), d'ADN complémentaire (ADNc), d'ARN messager (ARNm), d'ARN de transfert (ARNt), d'ARN ribosomique (ARNr), de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques, d'oligonucléotides modifiés ou non. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc... Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent être modifiés chimiquement.

Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin de même que des oligonucléotides courts ou des séquences plus longues. En particulier, les acides nucléiques sont avantageusement constitués par des plasmides, des vecteurs, des épisomes, des cassettes d'expression, etc... Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter une origine de répllication fonctionnelle ou non dans la cellule cible, un ou plusieurs gènes marqueurs, des séquences régulatrices de la transcription ou de la répllication, des gènes d'intérêt thérapeutique, des séquences antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc...

De préférence, l'acide nucléique comprend une cassette d'expression constituée d'un ou plusieurs gènes d'intérêt sous contrôle d'un ou plusieurs promoteurs et d'un terminateur transcriptionnel actifs dans les cellules cibles.

Au sens de l'invention, on entend par gène d'intérêt thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit protéique ainsi codé peut être notamment une protéine ou un peptide. Ce produit protéique peut être exogène homologue ou endogène vis-à-vis de la cellule cible, c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie. Dans ce cas, l'expression d'une protéine

permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène d'intérêt thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité
 5 modifiée, etc... Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut
 10 citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc... (FR 92/03120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques (BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc...) les apolipoprotéines (ApoAI, ApoAIV, ApoE, etc..., FR
 15 93/05125), la dystrophine ou une minidystrophine (FR 91/11947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs (p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc..., FR 93/04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation (Facteurs VII, VIII, IX), les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de
 20 l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les enzymes du métabolisme, catabolisme etc...

L'acide nucléique d'intérêt thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences
 25 peuvent, par exemple, être transcrites dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet la réalisation soit de vaccins soit de traitements
 5 immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncytia forming virus", d'autres virus ou encore de peptides antigéniques spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

10 Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène d'intérêt thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également
 15 s'agir de séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut
 20 citer par exemple les promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc... En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc... Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en
 25 amont du gène d'intérêt thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal

dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

Les compositions peuvent en outre comporter des adjuvants capables de s'associer aux complexes agent de transfert/acide nucléique et d'en améliorer le pouvoir transfectant. Dans un autre mode de mise en oeuvre, la présente invention concerne donc des compositions comprenant un acide nucléique, un agent de transfert d'acides nucléiques tel que défini ci-avant et un adjuvant capable de s'associer aux complexes agent de transfert/acide nucléique et d'en améliorer le pouvoir transfectant. La présence de ce type d'adjuvant (lipides, peptides ou protéines par exemple) peut permettre avantageusement d'augmenter le pouvoir transfectant des composés.

Dans cette optique, les compositions de l'invention peuvent comprendre comme adjuvant, un ou plusieurs lipides neutres. De telles compositions sont particulièrement avantageuses, notamment lorsque le rapport R est faible. La demanderesse a en effet montré que l'addition d'un lipide neutre permet d'améliorer la formation des particules nucléolipidiques et de favoriser la pénétration de la particule dans la cellule en déstabilisant sa membrane.

Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente invention sont des lipides à deux chaînes grasses. De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologique. Ils peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivés N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérébrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques

classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, Biochemistry).

5 Plus récemment, la demanderesse a démontré qu'il était également particulièrement avantageux d'employer à titre d'adjuvant, un composé intervenant ou non directement au niveau de la condensation dudit acide nucléique (WO 96/25508). La présence d'un tel composé, au sein d'une composition selon l'invention, permet de diminuer la quantité d'agent transfectant, avec les conséquences bénéfiques qui en découlent sur le plan toxicologique, sans porter un préjudice quelconque à l'activité transfectante. Par composé intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique, on entend définir un composé compactant, directement ou non, l'acide nucléique. Plus précisément, ce composé peut soit agir directement au niveau de l'acide nucléique à transfecter soit intervenir au niveau d'un composé annexe qui lui est directement impliqué dans la condensation de cet acide nucléique. De 10 préférence, il agit directement au niveau de l'acide nucléique. Par exemple, l'agent précompactant peut être n'importe quel polycation, par exemple la polylysine. Selon un mode de réalisation préféré, cet agent intervenant au niveau de la condensation de l'acide nucléique dérive en tout ou partie d'une protamine, d'une histone, ou d'une nucléoline et/ou de l'un de leurs dérivés. Un tel agent peut également être constitué, 15 en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10. Dans la structure du composé selon l'invention, ces motifs peuvent être répétés de manière continue ou non. C'est ainsi qu'ils peuvent être séparés par des liens de nature biochimique, par exemple un ou plusieurs acides aminés ou de nature chimique. 20

25 Préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent de 0,01 à 20 équivalents d'adjuvant pour un équivalent d'acides nucléiques en mol/mol et, plus préférentiellement, de 0,5 à 5.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux, les compositions de la présente invention comprennent en outre un élément de ciblage permettant

d'orienter le transfert de l'acide nucléique. Cet élément de ciblage peut être un élément de ciblage extracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'ADN vers certains, types cellulaires ou certains tissus souhaités (cellules tumorales, cellules hépatiques, cellules hématopoiétiques...). Il peut également s'agir d'un élément de ciblage

5 intracellulaire permettant d'orienter le transfert de l'acide nucléique vers certains compartiments cellulaires privilégiés (mitochondries, noyau etc...). L'élément de ciblage peut être lié à l'agent de transfert d'acides nucléiques selon l'invention ou également à l'acide nucléique comme cela a été précisé précédemment.

Parmi les éléments de ciblage utilisables dans le cadre de l'invention, on peut

10 citer les sucres, les peptides, les protéines, les oligonucléotides, les lipides, les neuromédiateurs, les hormones, les vitamines ou leurs dérivés. Préférentiellement, il s'agit de sucres de peptides ou de protéines tels que des anticorps ou des fragments d'anticorps, des ligands de récepteurs cellulaires ou des fragments de ceux-ci, des récepteurs ou des fragments de récepteurs, etc... En particulier, il peut s'agir de

15 ligands de récepteurs de facteurs de croissance, de récepteurs de cytokines, de récepteurs de type lectines cellulaires, ou de ligands à séquence RGD avec une affinité pour les récepteurs de protéines d'adhésion comme les intégrines. On peut également citer les récepteurs de la transferrine, des HDL et des LDL, ou le transporteur du folate. L'élément de ciblage peut également être un sucre permettant

20 de cibler des lectines tels que les récepteurs aux asialoglycoprotéines ou aux sialydés tel que le sialyde Lewis X, ou encore un fragment Fab d'anticorps, ou un anticorps simple chaîne (ScFv).

L'association des éléments de ciblage aux complexes nucléolipidiques peut être effectuée par toute technique connue de l'homme du métier, par exemple par

25 couplage à une partie hydrophobe ou à une partie qui interagit avec l'acide nucléique de l'agent de transfert selon l'invention, ou encore à un groupement qui interagit avec l'agent de transfert selon l'invention ou avec l'acide nucléique. Les interactions en question peuvent être, selon un mode préféré, de nature ionique ou covalente.

Selon une autre variante, les compositions de l'invention peuvent aussi incorporer au moins un agent de surface non-ionique en quantité suffisante pour stabiliser la taille des particules de complexes nucléolipidiques. L'introduction d'agents de surface non-ionique prévient la formation d'agrégats, ce qui rend la composition plus particulièrement adaptée à une administration *in vivo*. Les compositions selon l'invention incorporant de tels agents de surface présentent un avantage sur le plan de l'innocuité. Elles présentent également un avantage supplémentaire en ce sens qu'elles diminuent le risque d'interférences avec d'autres protéines compte tenu de la réduction de la charge globale des compositions de complexes nucléolipidiques.

Les agents de surface sont constitués avantageusement d'au moins un segment hydrophobe, et d'au moins un segment hydrophile. Préférentiellement, Le segment hydrophobe est choisi parmi les chaînes aliphatiques, les polyoxyalkylène, les polyester d'alkylidène, les polyéthylène glycol à tête polyéther benzylique et le cholestérol, et le segment hydrophile est avantageusement choisi parmi les polyoxyalkylène, les alcools polyvinyliques, les polyvinylpyrrolidones ou les saccharides. De tels agents de surface non-ioniques ont été décrits dans la demande PCT/FR 98/00222.

L'invention a également pour objet l'utilisation des composés tels que définis ci-avant pour le transfert d'acides nucléiques (et plus généralement de polyanions) dans les cellules, *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. Une telle utilisation est particulièrement avantageuse car les agents de transfert d'acides nucléiques selon l'invention présentent une cytotoxicité réduite par rapport aux lipides cationiques de l'art antérieur. La demanderesse a notamment mis en évidence qu'à des rapports de charge très élevés entraînant habituellement la mort des animaux consécutivement à la transfection, aucune cytotoxicité apparente n'était décelée.

Pour des utilisations *in vivo*, par exemple en thérapie ou pour l'étude de la régulation de gènes ou la création de modèles animaux de pathologies, les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée,

orale, rectale, vaginale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, intratrachéales, intrapéritonéale, etc... De préférence, les compositions de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une

5 injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de

10 solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une

15 injection directe dans les tissus, par exemple au niveau des tumeurs, ou les voies circulatoires, soit d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation *in vivo*, par injection ou greffe. Les tissus concernés dans le cadre de la présente invention sont par exemple les muscles, la peau, le cerveau, les poumons, le foie, la rate, la moelle osseuse, le thymus, le coeur, la lymphe, le sang, les os, les cartilages, le

20 pancréas, les reins, la vessie, l'estomac, les intestins, les testicules, les ovaires, le rectum, le système nerveux, les yeux, les glandes, les tissus conjonctifs, etc... Avantageusement, les tissus transfectés sont les muscles.

L'invention concerne en outre une méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules comprenant les étapes suivantes:

- (1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un composé tel que défini ci-avant,
- 25 pour former un complexe nucléolipidique, et
- (2) la mise en contact des cellules avec le complexe formé en (1).

La mise en contact des cellules avec le complexe peut être réalisée par incubation des cellules avec ledit complexe (pour des utilisations *in vitro* ou *ex vivo*), ou par injection du complexe dans un organisme (pour des utilisations *in vivo*).

L'incubation est réalisée de préférence en présence de par exemple de 0,01 à 1000 μg d'acide nucléique pour 10^6 cellules. Pour une administration *in vivo*, des doses d'acide nucléique comprises entre 0,01 et 10 mg peuvent par exemple être utilisées.

5 Dans le cas où les compositions de l'invention contiennent en outre un ou plusieurs adjuvants tels que définis précédemment, le ou les adjuvants sont préalablement mélangés au lipide selon l'invention ou à l'acide nucléique.

La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour le transfert d'acides nucléiques *in vivo*, notamment pour le traitement de maladies, comprenant l'administration *in vivo* ou *in vitro* d'un acide
10 nucléique codant pour une protéine ou pouvant être transcrit en un acide nucléique apte à corriger ladite maladie, ledit acide nucléique étant associé à un composé de formule générale (I) dans les conditions définies ci-avant. Plus particulièrement, cette méthode est applicable aux maladies résultant d'une déficience en un produit
15 protéique ou étant transcrit en un produit nucléique ou encore constituant ledit produit nucléique.

L'invention s'étend à toute utilisation d'un agent de transfert d'acides nucléiques selon l'invention pour la transfection *in vivo*, *ex vivo*, ou *in vitro* de cellules.

Les agents de transfert d'acides nucléiques de l'invention sont particulièrement
20 utilisables pour le transfert d'acides nucléiques dans des cellules primaires ou dans des lignées établies. Il peut s'agir de cellules fibroblastiques, musculaires, nerveuses (neurones, astrocytes, cellules gliales), hépatiques, hématopoïétiques (lymphocytes, CD34, dendritiques, etc...), épithéliales etc..., sous forme différenciées ou pluripotentes (précurseurs).

25 Outre les dispositions qui précèdent, la présente invention comprend également d'autres caractéristiques et avantages qui ressortiront des exemples et figures qui suivent, et qui doivent être considérés comme illustrant l'invention sans en limiter la portée.

FIGURES

Figure 1 : Structure des agents de transfert d'acides nucléiques 1, 2, 3 et 4 selon l'invention.

Figure 2 : Structure des vecteurs synthétiques RPR 120535, RPR 121650, RPR 120531, et RPR 122766 (décrits dans la demande de brevet WO 97/18185 incorporée à la présente par référence).

Figure 3 : Représentation schématique du plasmide pXL2774.

Figures 4 et 5 : Diagramme de phase des complexes agent de transfert/ADN. La liaison du lipide à l'ADN a été déterminée en suivant la diminution de la fluorescence (en %, 100% étant la fluorescence de l'ADN nu) du bromure d'éthidium (EtBr) (symbole ●, ligne pleine), comme décrit selon l'axe y situé à droite. La taille des particules de complexes (en nm) est indiquée sur l'axe y situé à gauche. L'axe x représente le rapport de charge agents de transfert/ADN. La taille des complexes nucléolipidiques sans co-lipide est représenté par le symbole ■ en ligne pleine. La taille des complexes nucléolipidiques contenant 25% de cholestérol est représenté par le symbole □ en ligne discontinue. La taille des complexes nucléolipidiques contenant 40% de DOPE est représenté par le symbole ◆ en ligne discontinue. La méthode ne permet pas de déterminer la taille des particules au delà de 3 µm.

Figure 6 : Activité de transfert de gène *in vitro* dans des cellules HeLa des complexes contenant le composé 1 selon la présente invention sans co-lipide (barre du milieu en gris foncé), avec 25% de cholestérol (barre de gauche en gris moyen), et avec 40% molaire de DOPE (barre de droite en gris clair), comparativement à l'ADN nu. Seuls les complexes dans lesquels l'ADN est complètement saturé en lipide et dont la taille est comprise entre 100 nm et 300 nm ont été utilisés.

Figure 7 : Activité de transfert de gène *in vivo* après injection directe dans le muscle des complexes contenant le composé 1 selon la présente invention ou le composé

gris moyen), et avec 40% molaire de DOPE (barre en gris clair), comparativement à l'ADN nu. Seuls les complexes dans lesquels l'ADN est complètement saturé en lipide et dont la taille est comprise entre 100 nm et 300 nm ont été utilisés.

5 Figure 8 : L'importance de l'invention est illustrée en comparant l'activité de transfert de gène de deux lipides différents, le composé 1 selon l'invention et le RPR 120531, et de l'ADN nu via deux routes d'administration : par voie intraveineuse (IV) et par voie intramusculaire (IM). Seuls les complexes dans lesquels l'ADN est complètement saturé en lipide et dont la taille est comprise entre 100 nm et 300 nm ont été utilisés.

10 ABREVIATIONS ET SYMBOLES

	AcOEt :	Acétate d' éthyle
	BOC :	t-Butoxycarbonyl
	BOP :	Benzotriazol-1-yloxytris (diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate
15	CH ₂ Cl ₂ :	Dichlorométhane
	CHCl ₃ :	Chloroforme
	DCC :	Dicyclohexylcarbodiimide
	DCE :	Dichloro 1-2 éthane
	DCU :	Dicyclohexylurée
20	DIEA :	N-Ethyldiisopropylamine
	DMAP :	4-Diméthylaminopyridine
	DMF :	Diméthylformamide
	DMSO :	Diméthyle sulfoxide
	DODA :	Diocadécylamine
25	EP :	Ether de pétrole
	Et Br :	Bromure d'éthydium
	EtOH :	Ethanol
	KHSO ₄ :	Sulfate de potassium
	MeOH :	Méthanol

	MeCN	Acétonitrile
	MgSO ₄ :	sulfate de magnésium
	NaCl :	Chlorure de sodium
	NaHCO ₃ :	carbonate de sodium
5	NaOH :	soude
	NEt ₃ :	Triéthylamine
	Rf :	Coefficient de rétention frontal
	TEA :	triéthylamine
	TFA :	Acide trifluoroacétique
10	THF :	Tétrahydrofurane
	TMS :	Tétraméthylsilane
	UV :	Ultra-Violets
	SPPS:	Solid Phase Peptide Synthesis
	CCM :	Chromatographie Couche Mince
15	CLHP:	Chromatographie Liquide à Haute Pression
	Z:	Benzyloxycarbonyl
	ClZ:	p-Chlorobenzyloxycarbonyl

MATERIEL ET METHODES

A\ MATERIEL

- 20 - Les acides aminés, polyaminés (ou leur dérivés) de départ sont disponibles commercialement. C'est le cas par exemple de : N-(3-aminopropyl)glycine, N-(2-cyanoethyl)glycine, 2,4-diaminobutyric acide, ou peuvent être synthétisées par des méthodes classiques.
- Les isothiourées cycliques sont également des produits commerciaux, comme par exemple le 2-Methylthio-2-Imidazoline hydro-iodide, ou peuvent être synthétisées par des méthodes classiques connues de l'homme du métier.
- 25 - Les amines lipides sont commerciales ou bien synthétisées à partir des amines et aldéhydes correspondants par réduction alkylative.

- Les produits triéthylamine, trifluoroacétique, BOP, DMAP, chloroformate de benzyle, diterbutyle dicarbonate sont des produits commerciaux. Les solutions de NaCl et NaHCO₃ sont saturées; la solution de KHSO₄ est de 0,5 M.

B\ METHODES

5 1) Mesures Physiques.

Les spectres de RMN Proton ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker 400 et 600 MHZ.

Les spectres de masse ont été réalisés sur un API-MS/III.

2) Méthodes de purification et d'analyse

10 a) Conditions de chromatographie en phase directe

- Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice Merck de 0,2 mm d'épaisseur.

Elles sont révélées soit aux U.V. (254nm), à la ninhydrine, en vaporisant (spray léger) une solution éthanolique de ninhydrine (40 mg/100 ml d'EtOH) pour révéler les amines ou les amides en chauffant à 150°C, à la fluorescamine, en vaporisant une solution (40 mg/100 ml d'acétone) pour révéler les amines primaires, au vert de bromocrésol, en vaporisant une solution (0,1% dans le propanol-2) pour révéler les acides, à la vanilline en vaporisant (spray léger) une solution éthanolique de vanilline (3%) avec 3% H₂SO₄ suivi d'un chauffage à 120°C, ou à l'iode en recouvrant la plaque de poudre d'iode.

- Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 Merck de granulométrie 0,063-0,200 mm.

b) Conditions de purification HPLC préparative

L'appareillage est un ensemble pour la chromatographie en phase liquide en mode gradient permettant une détection U.V. Cette chaîne préparative est composée des éléments suivants :

Pompe A : GILSON modèle 305 équipée d'une tête 50 SC.

Pompe B : GILSON modèle 303 équipée d'une tête 50 SC.

Boucle d'injection : 5 ml.

Module de pression : GILSON modèle 806.

Mélangeur : GILSON modèle 811 C équipé d'une tête de 23 ml.

5 Détecteur UV : GILSON modèle 119 équipé d'une cellule préparative.

Collecteur de fraction : GILSON modèle 202 équipé de portoirs n° 21 et de tube en verre de 10 ml.

Intégrateur : SHIMADZU modèle C-R6A.

10 Colonne : Colonne C4 (10mm) en acier inoxydable de 25 cm de longueur et de 2.2 cm de diamètre commercialisée par VYDAC modèle 214 TP 1022.

La solution de produit à purifier est chargée sur la colonne par l'intermédiaire de la boucle d'injection, l'éluat est recueilli par fractions de un tube en 30 secondes. Le détecteur est réglé aux longueurs d'onde de 220 nm et 254 nm.

les phases mobiles sont ainsi définie :

<u>Solvant A</u>		<u>Solvant B</u>	
Eau déminéralisée	2500 ml	Acétonitrile pour HPLC	2500 ml
Acide trifluoroacétique	2 ml	Acide trifluoroacétique	2,5 ml

15 Gradient :

Temps en min	% de solvant A	% de solvant B	Débit en ml/min
0	90	10	18
10	90	10	18
110	0	100	18
120	0	100	18

c) Techniques de chromatographie Analytique

- Les analyses HPLC (High performance Liquid Chromatography) ont été réalisées sur un appareil Merck-Hitachi équipé d'un intégrateur calculeur D 2500 HITACHI, d'un autosampler AS-2000A, d'une pompe intelligent L-6200A, et d'un détecteur UV-
20 vis L-4000 avec longueur d'onde réglable mise à 220 nm.

Les colonnes pour les séparations analytiques sont des colonnes Browlee en acier inoxydable de 3 cm de longueur et de 0,46 cm de diamètre commercialisées par APPLIED BIOSYSTEM.

- La phase stationnaire est constituée par de l'Aquapore Butyl 7 micron. Les phases mobiles sont l'eau (avec TFA) et l'acétonitrile (avec TFA). Les injections sont de 20 μ l d'une solution d'environ 1 mg/ml dans une vanne à boucle de 100 μ l. Le débit pour les analyses est réglé entre 1 ml/min et 4 ml/min. La pression est de 180 bars environ. Les conditions de séparation sont résumées ci-dessous :

	<u>Solvant A</u>	<u>Solvant B</u>
10	Eau déminéralisée 2500 mL	Acétonitrile pour HPLC 2500 mL
	Acide trifluoroacétique 2 mL	Acide trifluoroacétique 2.5 mL

Gradient :

Temps en min	% de solvant A	% de solvant B	Débit en ml/min
0	60	40	1
3	60	40	1
20	0	100	1
35	0	100	1
35.1	60	40	4
36.1	60	40	4
36.2	60	40	2
44	60	40	2

C\ MODE OPERATOIRE GENERAL

a) Méthode A : Couplage d'un acide organique avec une amine

- 15 L'acide organique (10 mmol) et l'amine (10 mmol) sont introduits dans un ballon de 250 ml, du CH_2Cl_2 (100 ml) est ajouté et le mélange est agité jusqu'à dissolution complète. Les produits DIEA (30 mmol) et BOP (11 mmol) sont ensuite ajoutés. Le

Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), le dichlorométhane est évaporé et le solide obtenu est repris dans de l'acétate d'éthyle (300 ml). La phase organique est lavée avec une solution de KHSO_4 (4 fois 100 ml), de NaHCO_3 (4 fois 100 ml), et de NaCl (4 fois 100 ml). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CCM, RMN et MS, et sont utilisés sans autres purifications. Les rendements sont de l'ordre de 90 %.

b) Méthode B : Clivage des groupements Boc

Le produit aminé protégé par des groupements Boc (1 mmol) est introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique. 30 ml de TFA à 4°C sont ajoutés, puis la solution est agitée pendant une heure. Lorsque la réaction est achevée (suivi par CCM et/ou CLHP), le TFA est évaporé sous vide puis le produit est séché par coévaporation avec 3 fois 30 ml d'éther éthylique.

c) Méthode C : Clivage des groupements Z

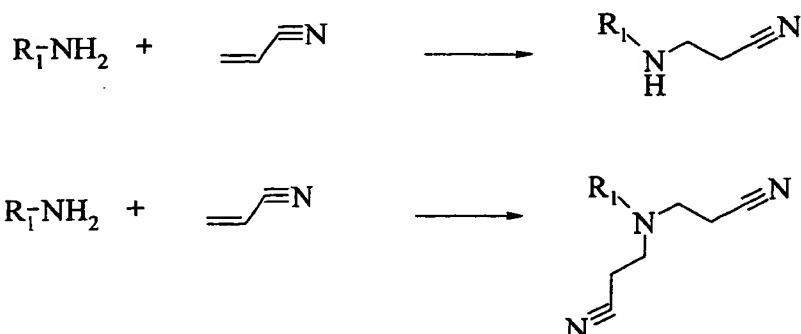
Les produits contenant des groupes Z ou ClZ sont introduit dans un ballon équipé d'un barreau magnétique et dissous dans 10 ml de MeOH/g de produit. Du palladium sur charbon (10%, 1g/g de produit) et du formiate d'ammonium (1 g/g de produit) sont ajoutés à température ambiante. L'hydrogénolyse est suivie par CLHP. Après deux heures la réaction est achevée, le mélange est filtré, et le filtre lavé avec 3 fois 10 ml de MeOH/g de produit. De l'eau double distillée est ajoutée et la solution est congelée et lyophilisée, ou bien le filtrat est concentré à sec et le solide est repris dans de l'acétate d'éthyle (300 ml). La phase organique est lavée par NaHCO_3 (2 fois 100 ml), et NaCl (2 fois 100 ml), puis elle est séchée sous MgSO_4 , filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CLHP et sont utilisés sans autres purifications. Les rendements sont de l'ordre de 90 %.

d) Méthode D : Préparation des Boc amino-acides ou Z amino-acides

L'acide-amino (0,1 mol/amine) est solubilisé dans de la soude 1N (200 ml/amine) et du dioxane (200 ml). La solution est agitée dans un bain de glace, puis on ajoute goutte à goutte une solution de $(\text{Boc})_2\text{O}$ ou ClZ (0,14 mol/amine) dans 200 ml de

- dioxane. Le pH est maintenu à une valeur supérieure à 9. Puis, le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Le dioxane est évaporé sous vide, puis on acidifie le mélange à pH 3 à l'aide d'une solution de KHSO_4 . Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 100 ml) puis lavé avec une solution de NaCl (2 fois 100 ml). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CCM et/ou CLHP.

e) Méthode E : Cyanoéthylation et dicyanoéthylation d'un amino acide



Cyanoéthylation :

- 10 Dans un ballon, l'acide-amino (0,05 mol) et NaOH (0,1 mol) sont solubilisés dans 150 ml d'eau. La solution est refroidie dans un bain de glace. Sous vive agitation, on coule lentement de l'acrylonitrile (0,05 mol) en gardant la température de la masse inférieure à 20°C . Le mélange de réaction est maintenu une nuit à température ambiante.
- 15 Le solvant est évaporé sous vide, puis le mélange est acidifié à pH 3 avec une solution de KHSO_4 . Ce qui est insoluble est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 fois 200 ml), puis lavé avec une solution de NaCl (2 fois 100 ml). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis filtrée et évaporée sous vide.
- Le brut est éventuellement purifié sur une colonne de silice.

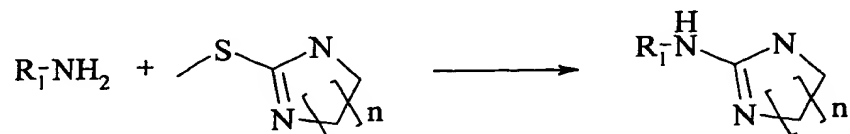
Dicyanoéthylation :

La procédure est identique à celle décrite ci-dessus, avec 0,12 mol d'acrylonitrile. Une étape de maintien du mélange à 50°C pendant deux heures est ajoutée après l'étape à température ambiante toute une nuit.

f) Méthode F : Réduction du nitrile d'un cyano-amino-acide

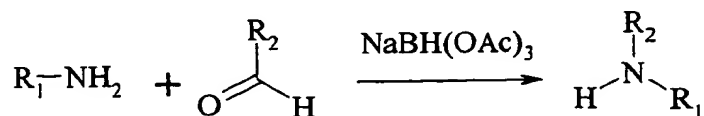
Dans un autoclave en inox de 1 litre, on introduit le cyano-amino-acide (50 mmol). On prépare en même temps dans un b cher une solution de 10 ml d'éthanol (95%) et de 3,3 g de NaOH (80 mol). Lorsque la soude est dissoute, on introduit cette solution
 5 dans l'autoclave. Un courant d'azote est passé dans l'autoclave et on introduit 2 ml de Nickel de Raney sur charbon. L'autoclave est fermé. La pression initiale d'hydrogénation est de 52 bar, et elle descend à 48,5 bar en une nuit à température ambiante. La suspension est filtrée sur papier, le filtre est lavé avec de l'éthanol (4 fois 25 ml), et les filtrats sont concentrés à sec sous vide. On obtient un solide blanc
 10 qui est utilisé sans autres purifications après une analyse CCM.

g) Méthode G : Introduction d'un cycle guanidine à partir d'hydro-iodure d'isothiour a cyclique



Le produit contenant l'amine primaire à modifier (1 mmol/amine) est solubilisé dans
 15 du CH₂Cl₂ (10 ml), puis on ajoute l'hydro-iodure d'isothiour a cyclique (1,2 mmol/amine) et le TEA (1,3 mmol/amine). Le mélange est agité à température ambiante jusqu'à l'arrêt du dégagement de sulfure de méthyle. A la fin de la réaction (suivie par CLHP), le CH₂Cl₂ est évaporé sous vide.

h) Méthode H : Synthèse d'amine dilipidique



20

Dans un ballon, l'amine lipidique (0,02 mol) et l'aldéhyde lipidique (0,02 mol) sont solubilisés dans 200 ml de DCE. La solution est agitée, puis du triac toxyborohydrure de sodium (0,028 mol) est ajouté. Le mélange est maintenu sous agitation durant une nuit. 200 ml de CHCl₃ sont coulés, puis la solution est lavée avec NaHCO₃ (2 fois

100 ml), et NaCl (2 fois 100 ml). La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis filtrée et évaporée sous vide. Les produits sont analysés par CCM, puis purifiés sur une colonne de silice ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$). Les rendements sont voisin de 50 %.

EXEMPLES

5 A\ SYNTHESSES DES AGENTS DE TRANSFECTION

Exemple 1 : synthèse du composé 1 (N-dioctadécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]-propylamino}-acétamide) à partir du composé RPR 120535A (dont la préparation a été décrite dans la demande de brevet WO 97/18185 et dont la structure est représentée à la figure 2).

- 10 Dans un ballon équipé d'un barreau magnétique, on dissout 0,784 mmol de RPR 120535A dans 25 ml de méthanol, et on ajoute 10,21 mmol de triéthylamine. Puis on coule lentement (5 minutes) sur le mélange une solution de O-Methylisourea et d'acide sulfurique H_2SO_4 (1,173 mmol) dans de l'eau (9 ml). Le mélange est maintenu à 50°C dans un bain d'huile pendant vingt heures.
- 15 Ensuite, le mélange est concentré à sec au rotoévaporateur. On solubilise l'extrait sec avec une solution d'eau (4 ml), d'éthanol (4 ml), et d'acide trifluoroacétique (1 ml). Cette solution est injectée en deux fois en CLHP préparative.
- Les fractions intéressantes (déterminées par CLHP analytique) sont regroupées, congelées et lyophilisées. On obtient ainsi 194 mg (0,163 mmol) de produit
- 20 salifié.

Rendement : 20,8 %

CLHP analytique : $R_t = 15,99$ minutes.

- Spectre de RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d6, δ en ppm) : 0,88 (t, $J = 6,5$ Hz, 6H : CH_3 des chaînes grasses) ; 1,24 (mt, 60H : CH_2 centraux des chaînes grasses) ; de
- 25 1,35 à 1,70 (mt, 4H : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 1,57 (mt, 4H : $(\text{CH}_2)_2$ centraux du butyle) ; 1,88 et 1,96 (2 mts, 2H chacun: CH_2 central du propyle et CH_2 central du cycle) ; de 2,85 à 3,35 (2 mts, 16H en totalité : les 8 NCH_2) ; 3,81 (s large, 2H : NCH_2CON) ; 4,03 (d, $J = 5$ Hz, 2H : CONCH_2CON du glycyle) ; 7,25 et 7,84

(respectivement s et s large, 1H chacun : les 2 NH du cycle) ; 8,61 (t, J = 5,5 Hz, 1H : NHCO) ; 8,70 et 9,02 (2 mfs, 1H chacun : les 2 NH).

$MH^+ = 846$

- Exemple 2 : synthèse du composé 2** (N-ditétradécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]-propylamino}-acétamide) à partir du composé RPR 122766A (dont la préparation a été décrite dans la demande de brevet WO 97/18185 et dont la structure est représentée à la figure 2).

- Dans un ballon équipé d'un barreau magnétique on dissout 1,036 mmol de RPR 122766A dans 30 ml de méthanol, et on ajoute 13,13 mmol de triéthylamine. Puis on coule lentement (5 minutes) sur le mélange une solution de O-Methylisourea et d'acide sulfurique H_2SO_4 (1,554 mmol) dans de l'eau (9 ml). Le mélange est maintenu à 50°C dans un bain d'huile pendant une vingtaine d'heures. Puis, le mélange est concentré à sec au rotoévaporateur. On solubilise l'extrait sec avec une solution d'eau (3 ml), d'éthanol (2 ml), et de d'acide trifluoroacétique (0,5 ml). Cette solution est injectée en CLHP préparative.

Les fractions intéressantes (déterminées par CLHP analytique) sont regroupées, congelées et lyophilisées. On obtient finalement 218 mg (0,2022 mmol) de produit salifié.

Rendement : R = 19,5 %

- CLHP analytique : Rt = 10.76 minutes.

- Spectre de RMN 1H (400 MHz, $(CD_3)_2SO$ d6, δ en ppm) : 0,88 (t, J = 7 Hz, 6H : CH_3 des chaînes grasses) ; de 1,15 à 1,40 (mt, 44H : $(CH_2)_{11}$ centraux des chaînes grasses) ; 1,45 et de 1,50 à 1.65 (2 mts, 2H chacun : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 1,59 (mt, 4H : les 2 CH_2 centraux du butyle) ; 1,91 et 1,97 (2 mts, 2H chacun : CH_2 central des propyles) ; de 2,85 à 3,10 (mt, 10H : les 2 NCH_2 du butyle - les 2 NCH_2 d'un des 2 propyles - et 1 des 2 NCH_2 de l'autre propyle) ; 3,23 et de 3,30 à 3,50 (2 mts, respectivement 5H et 1H : l'autre NCH_2 de l'autre propyle et NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,79 (mf, 2H : NCH_2CON) ; 4,03 (d, J = 5 Hz, 2H : $CONCH_2CON$ du glycyde) ; 7.27 et de 8,40 à 9,30 (respectivement s large et mf, 2H et 4H : NH_2^+

CF_3COO^- , NH^+ CF_3COO^- et $=\text{NH}$) ; 7,88 et 8,61 (respectivement s et s large, 1H chacun : respectivement $\text{NHC}=\text{N}$ et CONH).

$\text{MH}^+ = 734$

Exemple 3 : synthèse du composé 3 (2-(3-{4-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propylamino]-butylamino}-propylamino)-N-ditétradécylcarbamoylméthyl-acétamide) à partir du composé RPR 122766A (dont la préparation a été décrite dans la demande de brevet WO 97/18185 et dont la structure est représentée à la figure 2).

Dans un ballon équipé d'un compte-bulle et d'un barreau magnétique, on dissout 0,36 mmol de iodure de 2-méthylmercapto-2-imidazolinium dans 0,36 ml de soude 1N. A cette solution on ajoute 0,36 mmol de RPR 122766A préalablement dissout dans 1,44 ml de soude 1N, 5 ml d'eau, et 4 ml d'éthanol. Le mélange est maintenu sous agitation jusqu'à l'arrêt de dégagement de méthyl mercaptan (24 heures). Le mélange est ensuite concentré à sec au rotoévaporateur. On solubilise l'extrait sec avec une solution d'eau (4 ml), d'éthanol (4 ml), et de d'acide trifluoroacétique (0,5 ml). Cette solution est injectée en deux fois en CLHP préparative.

Les fractions intéressantes (déterminées par CLHP analytique) sont regroupées, congelées et lyophilisées. On obtient finalement 213 mg (0,1727 mmol) de produit salifié.

Rendement : R = 48 %

HPLC_{analytique} : Rt = 8,90 minutes.

Spectre de RMN ^1H (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ d6 avec ajout de quelques gouttes de CD_3COOD d4, δ en ppm) : 0,87 (t, J = 7 Hz, 6H : CH_3 des chaînes grasses) ; de 1,15 à 1,40 (mt, 44H : $(\text{CH}_2)_{11}$ centraux des chaînes grasses) ; 1,45 et 1,55 (2 mts, 2H chacun : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; 1,65 (mt, 4H : les 2 CH_2 centraux du butyle) ; de 1,80 à 1,95 (mt, 4H : CH_2 central des propyles) ; de 2,80 à 3,05 (mt, 10H : les 2 NCH_2 du butyle - les 2 NCH_2 d' un des 2 propyles - et 1 des 2 NCH_2 de l'autre propyle) ; 3,24 (mt, 6H : l'autre NCH_2 de l'autre propyle et NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,56 (s, 2H : NCH_2CON) ; 3,62 (s, 4H : $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}$) ; 4,02 (d, J = 5 Hz, 2H : CONCH_2CON du glycyle).

$\text{MH}^+ = 777$

Exemple 4 : Synthèse du composé 4 (2-(3-{bis-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propyl]-amino}-propylamino)-N-ditétradécylcarbamoylméthyl-acetamide) par la méthode de synthèse de briques.

a) SYNTHÈSE DU BOC-GLY-DITETRADECYLAMINE (1)

- 5 Le Boc-Gly est couplé à la ditétradécylamine selon la méthode A décrite dans la partie "Matériel et Méthodes". Le rendement est de 93%.

CCM : $R_f = 0,9$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1)

MH⁺ : 567

b) SYNTHÈSE DE $[\text{Z-NH}(\text{CH}_2)_3]_2\text{-N}-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Boc-CH}_2\text{-COOH}$ (2)

10 1) Synthèse de $\text{NC}-(\text{CH}_2)_2\text{-NH-Boc-CH}_2\text{-COOH}$ (3)

L'amine de la N-(cyanoéthyl)-glycine est protégée par un groupement Boc suivant la méthode D décrite dans la partie "Matériel et Méthodes". Le rendement est de 98%.

CCM : $R_f = 0,66$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 8:2)

15 MH⁺ : 229

2) Synthèse de $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Boc-CH}_2\text{-COOH}$ (4)

Le produit (3) est hydrogéné selon la méthode F décrite dans la partie "Matériel et Méthodes".

CCM : $R_f = 0,12$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 6:4)

20 MH⁺ : 233

3) Synthèse de $[\text{NC}(\text{CH}_2)_2]_2\text{-N}-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Boc-CH}_2\text{-COOH}$ (5)

Le produit (4) est dicyanoéthylé suivant la méthode E décrite dans la partie "Matériel et Méthodes". Le rendement est de 50%.

CCM : $R_f = 0,75$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 6:4)

25 MH⁺ : 339

4) Synthèse de $[\text{Z-NH}-(\text{CH}_2)_3]_2\text{-N}-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Boc-CH}_2\text{-COOH}$ (2)

Le produit (5) est hydrogéné suivant la méthode F décrite dans la partie "Matériel et Méthodes".

CCM : $R_f = 0,14$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 6:4)

Puis les amines sont protégées par des groupements Z suivant la méthode D décrite dans la partie "Matériel et Méthodes". Le Produit brut est purifié sur une colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 8:2).

- 5 On obtient une meringue blanche avec un rendement de 66% par rapport au produit (4).

CCM : $R_f = 0,42$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 6:4)

MH⁺ : 615

c) SYNTHÈSE DE $[\text{Z-NH}(\text{CH}_2)_3]_2\text{-N}-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Boc-CH}_2\text{-COGlyN}[(\text{CH}_2)_{13}\text{-CH}_3]_2$ (6)

- 10 Le Boc du produit (1) est clivé suivant la méthode B décrite dans la partie "Matériel et Méthodes".

CLHP : $R_t = 12,86$ min, ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

- 15 Le produit obtenu est couplé avec le produit (2) suivant la méthode A décrite dans la partie "Matériel et Méthodes". Le rendement est de 75% après purification sur une colonne de silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 8:2).

CCM : $R_f = 0,86$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 8:2)

CLHP : $R_t = 17,44$ min, ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

- 20 d) SYNTHÈSE DE $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3]_2\text{-N}-(\text{CH}_2)_3\text{-NH-Boc-CH}_2\text{-COGlyN}[(\text{CH}_2)_{13}\text{-CH}_3]_2$ (7)

Les groupements Z sont clivés suivant la méthode C décrite dans la partie "Matériel et Méthodes". Un rendement de 40% est obtenu par rapport au produit (6).

- 25 CLHP : $R_t = 9,62$ min, ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

MH⁺ : 795.

e) SYNTHÈSE DU COMPOSE 4 (8)

L'hydro-iodure de 2-méthylthio imidazoline réagit sur le produit (7) suivant la méthode G décrite dans la partie "Matériel et Méthodes". Le Boc est clivé selon la

méthode B décrite dans la partie "Matériel et Méthodes". Le produit est purifié par CLHP préparative et les fractions analysées par CLHP. Le rendement est de 34%.

CLHP : $R_t = 10,07$ min, ($H_2O/MeCN$: 3 min [40/60], 3-20 min [0/100], 35 min [0/100]).

- 5 Spectre de R M N 1H (400 MHz, $(CD_3)_2SO$ d_6 à une température de 383K, d en ppm) : 0,92 (t, $J = 7$ Hz, 6H : CH_3 des chaînes grasses) ; de 1,25 à 1,45 (mt, 44H : $(CH_2)_{11}$ centraux des chaînes grasses) ; 1,57 (mt, 4H : 1 CH_2 de chaque chaîne grasse) ; de 1,70 à 1,90 (mt, 6H : CH_2 central des propyles) ; de 2,50 à 3,40 (mt, 16H : les 2 NCH_2 des propyles et les NCH_2 des chaînes grasses) ; 3,68 (s, 8H : les 2 NCH_2CH_2N) ; 3,72 (s large, 2H : NCH_2CON) ; 4,06 (s, 2H : $CONCH_2CON$ du glycyle).
- 10 MH^+ : 831.

B\ UTILISATION DES AGENTS DE TRANSFECTION SELON L'INVENTION

Exemple 5 : préparation de complexes nucléolipidiques

Cet exemple illustre la préparation de complexes agents de transfert / ADN.

- 15 Le lipide cationique utilisé dans cet exemple et dans les exemples qui suivent est le composé 1 (figure 1) en solution dans du chloroforme. Des quantités de 10 nmoles de composé 1 (soit 11,8 μg de composé 1) par μg d'ADN ont été utilisées. Dans certains cas, un co-lipide neutre, Cholestérol ou DOPE, est préalablement mélangé au lipide cationique. Un film lipidique fin se forme lorsqu'on évapore le
- 20 chloroforme à l'aide d'un flux léger d'argon, puis il est réhydraté dans un mélange de dextrose 5% et de chlorure de sodium 20 mM, pendant toute une nuit, à 4°C. Les échantillons sont ensuite traités aux ultrasons pendant 5 minutes, chauffés à 65°C pendant 30 minutes, et enfin traités à nouveau aux ultrasons pendant 5 minutes. On obtient ainsi des suspensions lipidiques qui sont stockées à 4°C jusqu'à leur
- 25 utilisation.

L'ADN utilisé est le plasmide pXL2774 (figure 3) en solution dans un mélange de dextrose 5% et de chlorure de sodium 20 mM à une concentration de 0,5 mg/ml ou 1,0 mg/ml. Le plasmide pXL2774 possède les caractéristiques suivantes :

- niveau d'endotoxines inférieur à 50 EU/mg,
- Taux d'ADN superenroulé supérieur à 60%,
- contenu d'ARN, c'est-à-dire d'ARNm, d'ARNt et d'ARN ribosomique, (déterminé par HPLC) inférieur à 5%,
- 5 - taux d'ADN chromosomal inférieur à 1%,
- contenu protéique inférieur à 1%,
- osmolarité inférieure à 15 mosmoles/kg.

On prépare les complexes agent de transfection/ADN en mélangeant rapidement des volumes égaux de solution d'ADN et de suspension lipidique telles
 10 que décrites ci-dessus. La quantité de lipide complexé à l'ADN varie de 0,5 nmoles/ μ g d'ADN à 12 nmoles/ μ g d'ADN.

Exemple 6 : comportement des complexes formés à différent rapport de charge

Cet exemple illustre le comportement des complexes agent de transfection/ADN à différents rapport de charge. L'impact de l'ajout d'un co-lipide
 15 neutre est également illustré.

La taille des complexes a tout d'abord été analysée en mesurant le diamètre hydrodynamique par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Laser Light Scattering) à l'aide d'un appareil Coulter N4plus. les échantillons sont dilués 20 fois
 20 dans une solution contenant 5% de dextrose et 20 mM de chlorure de sodium NaCl pour éviter les diffusions multiples. L'effet de la tête cycloamidine, de la composition lipidique, et du rapport de charge agents de transfert/ADN sur la taille des complexes a ainsi été étudié.

En règle générale, on distingue trois phases possibles lorsqu'on augmente le rapport de charge agents de transfert/ADN. Ces trois phases déterminent le potentiel
 25 thérapeutique de l'agents de transfert d'acides nucléiques en question. Les figures 4 et 5 illustrent ces phases pour différents lipides cationiques : le RPR 120535, le RPR 121650 (qui ont tous deux été décrits dans la demande de brevet WO 97/18185), et le composé 1 selon l'invention.

A faible rapport de charge, l'ADN n'est pas saturé par le lipide cationique. Il reste encore de l'ADN nu, et les complexes sont globalement chargés négativement. Les particules sont de petite taille (entre 100 et 300 nm). Cette phase est appelée "Phase A".

5 Le fait que l'ADN ne soit pas complètement saturé par le lipide cationique signifie que l'ADN n'est pas complètement protégé par le lipide. L'ADN peut donc être soumis aux dégradations par les enzymes (DNAases). Par ailleurs, les complexes étant globalement négatifs, le passage de la membrane cellulaires est difficile. Pour ces raisons, les complexes nucléolipidiques de la phase A sont relativement inactifs.

10 A rapport de charge intermédiaire, l'ADN est complètement saturé par le lipide cationique, et les complexes sont globalement neutres ou légèrement positifs. Cette phase est instable car les répulsions ioniques sont minimales et un phénomène de "crosslinking" peut se produire. La taille des particules est bien au dessus de la limite de détection par diffusion dynamique de la lumière (très supérieure à 3 μ m). Cette phase instable est appelée "phase B".

15 Une telle taille de complexes n'est pas adaptée pour des utilisations en injection. Cependant, bien que le complexe RPR 120535/DOPE/ADN à un rapport de charge de 5 forme des gros agrégats qui précipitent, il a été trouvé actif en transfert de gène. Ainsi, les complexes ne sont pas forcément inactifs dans la phase B, mais ils sont
20 seulement sous une formulation qui n'est pas appropriée pour leur injection dans un but pharmaceutique.

A rapport de charge relativement élevé, l'ADN est sur-saturé par le lipide cationique, et les complexes sont globalement positifs. Du fait des fortes répulsions entre les charges positives, cette phase est stable. Elle est désignée sous le nom de
25 "phase C".

Contrairement à la phase C, les complexes nucléolipidiques sont sous une forme telle que l'ADN est très bien protégé vis-à-vis des enzymes, et leur charge globalement positive facilite le passage de la membrane cellulaire de nature anionique. Les complexes de la phase C sont donc particulièrement adaptés à une utilisation pour le
30 transfert d'acides nucléiques dans les cellules.

En plus de la tête cycloamidine du lipide cationique, l'utilisation d'un co-lipide neutre a un fort impact sur la stabilité des complexes, comme cela est illustré figure 4 et figure 5. les co-lipides ajoutés dans ces exemples sont soit du DOPE (lipide cationique/DOPE = 3/2), soit du cholestérol (lipide cationique /cholestérol = 3/1). En général, l'ajout du co-lipide neutre augmente l'instabilité des complexes, ce qui entraîne l'augmentation de la quantité de lipide cationique requise pour atteindre la phase C.

Il faut noter que les valeurs du rapport de charge qui délimitent les trois phases A, B et C dépendent du lipide cationique utilisé. Ainsi, ces valeurs peuvent varier très fortement d'un lipide à l'autre.

Dans un second temps, l'affinité de l'agents de transfert vis-à-vis de l'ADN en fonction du rapport de charge a été étudiée. Pour cela, la réduction de fluorescence après ajout de 3 µg de bromure d'éthidium (EtBr) a été mesurée. En effet, la substitution du bromure d'éthidium de l'ADN par le lipide est une indication de liaison à l'ADN.

Les formulations utilisées sont diluées 20 fois jusqu'à une concentration finale de 25 µg d'ADN/ml. La fluorescence relative mesurée pour l'ADN nu est définie comme étant 100%. Le taux de liaison avec l'agent de transfert d'acides nucléiques est représenté par la réduction de la fluorescence relative de l'échantillon. Les figures 4 et 5 montrent que la fluorescence diminue quand le rapport de charge augmente, ce qui signifie qu'une plus grande quantité de lipide cationique est disponible pour se lier à l'ADN (plus la fluorescence décroît, plus une grande quantité de lipide cationique se lie à l'ADN jusqu'à atteindre la saturation).

De cette façon, il a été ainsi montré que l'affinité du lipide cationique pour l'ADN est déterminée par la tête cycloamidine, mais pas par l'addition d'un co-lipide.

Exemple 7 : transfection *in vitro*

Cet exemple illustre la capacité des agents de transfert selon l'invention à transférer l'ADN dans les cellules *in vitro*, comparativement à l'ADN nu.

Des microplaques de 24 puits sontensemencées avec 60000 cellules HeLa (ATCC) par puit, et transfectées 24 heures plus tard. Des complexes contenant 1 µg d'ADN sont dilués dans 0,5 ml de milieu de culture DMEM (Gibco/BRL) en l'absence de sérum, puis ajoutés dans chaque puit. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 4 heures. Le milieu contenant les complexes est ensuite enlevé et remplacé par un mélange de DMEM et de 10% de sérum de veau foetal. Puis, les cellules sont à nouveau mises en culture pendant 24 heures. Enfin, les cellules sont lysées et testées en utilisant un kit de test de luciférase (Promega) et un luminomètre Dynex MLX.

Les résultats indiqués à la figure 6 soulignent la différence entre les performances de l'ADN nu par rapport aux complexes de l'invention totalement saturés composé 1/ADN : aucune activité luciférase n'a pu être détectée (sensibilité de l'appareil inférieure à 1 pg par puit) après transfection *in vitro* d'ADN nu, alors que l'activité de transfert de gène des complexes selon l'invention varie de 200 pg/puit à 8000 pg/puit.

Cet exemple montre donc clairement l'utilisation avantageuse des composés selon l'invention pour la transfection des cellules *in vitro*.

Exemple 8 : transfection *in vivo*

Cet exemple illustre la capacité des agents de transfert selon l'invention à transférer l'ADN dans les cellules *in vivo*, comparativement à l'ADN nu et à un lipide cationique connu, le RPR 120531 décrit dans la demande WO 97/18185 et dont la structure est représentée représenté à la figure 2.

Le transfert de gène *in vivo* a été effectué sur des souris Balb/C par administration intramusculaire et intraveineuse. Les formulations qui ont été comparées sont des formulations d'ADN nu, des formulations contenant le RPR 120531, ou des formulations contenant le composé 1 selon l'invention.

Dans le cas des injections intramusculaires, chaque souris a reçu 30 µl de formulation contenant 15 µg d'ADN dans le muscle antérieur du tibia. Les tissus sont récupérés 7 jours après l'injection, ils sont congelés et stockés à -80°C en attendant d'effectuer les tests d'activité luciférase. Les mesures d'activité luciférase se font comme dans l'exemple 6.

Dans le cas des injections par voie intraveineuse, chaque souris a reçu 200 µl de formulation contenant 50 µg d'ADN. Les tissus sont récupérés dans ce cas 24 heures après l'injection, puis congelés et stockés de la même façon que précédemment.

Les résultats de transfert de gène *in vivo* sont présentés figure 7 et figure 8. Le rapport entre le composé 1 et l'ADN est de 10 nmoles/µg d'ADN. Le rapport entre le RPR 120531 et l'ADN est de 4 nmoles/µg d'ADN.

La figure 7 illustre l'activité *in vivo* du composé 1 selon l'invention comparativement à l'ADN nu et au RPR 120531. On constate que les niveaux d'activité luciférase sont équivalents entre l'ADN nu et le composé 1, ce dernier présentant en outre une activité très améliorée par rapport au RPR 120531. Les mécanismes de transfert impliqués semblent différents entre l'ADN nu et l'utilisation du composé 1 selon la présente invention. En effet, les complexes selon l'invention utilisés ne contiennent pas d'ADN libre (phase C) et de plus, leurs résultats *in vitro* sont très supérieurs à ceux de l'ADN nu.

La figure 8 compare les activité du composé 1 selon l'invention, de l'ADN nu et du RPR 120531, par voie intraveineuse et par voie intramusculaire.

On constate que l'efficacité de transfection est à peu près équivalente par voie intraveineuse pour les deux lipides cationiques. Par contre, par voie intramusculaire, l'efficacité de transfection du composé 1 selon l'invention est très nettement supérieure.

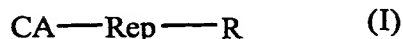
Par rapport à l'ADN nu, le composé 1 présente une transfection par voie intraveineuse, en plus de la transfection au moins équivalente par voie intramusculaire.

Il apparaît donc que l'efficacité de transfert de l'acide nucléique *in vivo* du composé 1 selon l'invention est globalement supérieure à celle de l'ADN nu et du RPR 120531.

5 Enfin, il apparaît que les complexes selon l'invention possèdent l'avantage, par rapport à la transfection d'ADN nu, de protéger l'ADN des dégradations par les nucléases, contribuant ainsi à une amélioration significative de la stabilité des formulations. Les composés de la présente invention peuvent être également utilisés pour protéger l'ADN des détériorations au cours de la lyophilisation, améliorant là encore la stabilité des formulations.

REVENDICATIONS

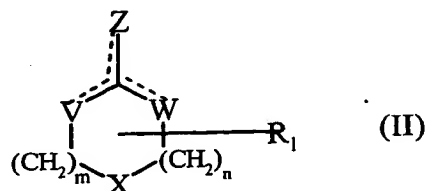
1. Agent de transfert d'acides nucléiques, sous forme D, L ou DL, ainsi que ses sels, de formule générale (I) :



5

pour laquelle :

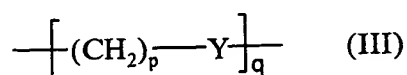
① CA représente une tête cycloamidine et ses formes mésomères de formule générale (II) :



10 pour laquelle :

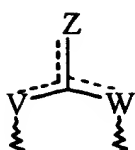
- m, et n sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 3 inclus et tels que $m+n$ est supérieur ou égal à 1,

- R_1 représente un groupement de formule générale (III) :

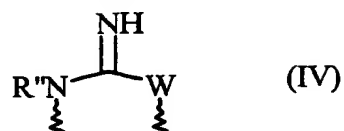


15 pour laquelle p et q sont des entiers indépendants l'un de l'autre compris entre 0 et 10 inclus, et Y représente un groupement carbonyle, amine, méthylamine, ou bien méthylène, Y pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements $[(\text{CH}_2)_p - \text{Y}]$, et étant entendu que R_1 peut être lié à n'importe quel atome de la formule générale (II),

20 • X représente un groupement NR_2 ou bien CHR_2 , R_2 étant soit un atome d'hydrogène soit le groupement R_1 tel que défini précédemment,

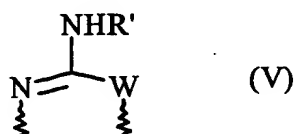
• Le groupement  représente :

* 1^{er} cas : un groupement de formule générale (IV) :



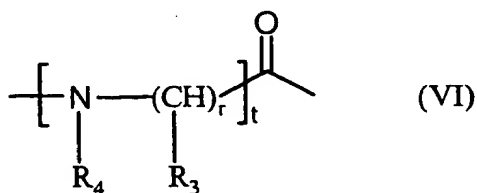
5 pour laquelle W représente CHR''' ou bien NR''', et R'' et R''' représentent indépendemment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou le groupement R₁ tel que défini précédemment, étant entendu que R'' et R''' ne peuvent pas être R₁ en même temps, ou bien

* 2^{ème} cas : un groupement de formule générale (V) :



10 pour laquelle W représente CHR''' ou bien NR''', et R' et R''' représentent indépendemment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un méthyle, ou le groupement R₁ tel que défini précédemment, étant entendu que R' et R''' ne peuvent pas être R₁ en même temps,

② Rep est absent ou est un répartiteur de formule générale (VI) :



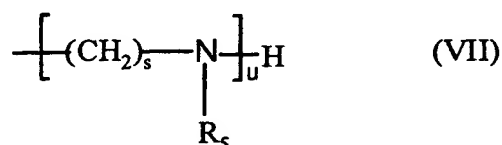
15

dont l'atome d'azote est rattaché à CA, et :

• t est un entier compris entre 0 et 8 inclus,

• r est un entier compris entre 0 et 10 inclus, r pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements $\text{-NR}_4\text{-(CH)}_r\text{-}$,

• R_3 , qui peut avoir des significations différentes au sein des différents groupements $\text{NR}_4\text{-(CH)}_r\text{R}_3$, représente un atome d'hydrogène, un groupement méthyle, ou un groupement de formule générale (VII) :



pour laquelle u est un entier compris entre 1 et 10 inclus, s est un entier compris entre 2 et 8 inclus pouvant avoir des significations différentes au sein des différents groupements $\text{-(CH}_2\text{)}_s\text{-NR}_5$, et R_5 est un atome d'hydrogène, un groupement CA tel que définis précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, ou bien un groupement de formule générale (VII) étant entendu que les groupements de formule générale (VII) sont indépendants les uns des autres et peuvent avoir des significations différentes,

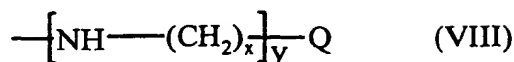
• R_4 est défini de la même façon que R_3 ou bien représente un groupement CA tel que défini précédemment étant entendu que les groupements CA sont indépendants les uns des autres et peuvent être différents, et

③ R est lié à la fonction carbonyle du groupement Rep de formule générale (VI), ou bien si Rep est absent R est lié directement à CA, et représente :

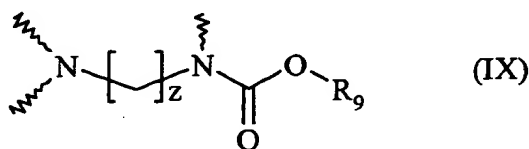
* soit un groupement de formule NR_6R_7 pour laquelle R_6 et R_7 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical aliphatique saturé ou non, linéaire ou ramifiée, éventuellement fluoré, contenant 1 à 22 atomes de carbone, avec l'un au moins des deux substituants R_6 ou R_7 différent de l'hydrogène et l'autre contenant entre 10 et 22 atomes de carbone,

* soit un dérivé de stéroïde,

* soit un groupement de formule générale (VIII) :



pour laquelle x est un entier compris entre 1 et 8 inclus, y est un entier compris entre 1 et 10 inclus, et soit Q représente un groupement $\text{C}(\text{O})\text{NR}_6\text{R}_7$ pour lequel R_6 et R_7 sont définis comme précédemment, soit Q représente un groupement $\text{C}(\text{O})\text{R}_8$ pour lequel R_8 représente un groupement de formule (IX) :



pour laquelle z est un entier compris entre 2 et 8 inclus, et R_9 est un radical aliphatique saturé ou non , éventuellement fluoré, contenant 8 à 22 atomes de carbone, ou un dérivé de stéroïde,
ou bien R_8 représente un groupement $-\text{O}-\text{R}_9$ pour lequel R_9 est défini comme ci-dessus.

2. Agent de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 1 caractérisé en ce que, dans le groupement de formule (VI), R_3 et R_4 représentent des atomes d'hydrogène ou bien R_4 représente un atome d'hydrogène et R_3 est un groupement de formule (VII) tel que défini dans la revendication 1 pour lequel R_5 représente une tête cycloamidine CA.

3. Agent de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 1 caractérisé en ce que la tête cycloamidine CA de formule (II) comporte 5, 6, 7, ou 8 chaînons.

4. Agent de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 1 caractérisé en ce que, dans la formule (III), p et q sont choisis indépendamment l'un de l'autre parmi 2, 3, ou 4.

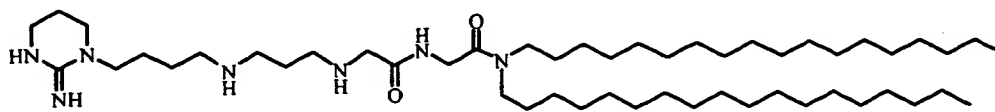
5. Agent de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 1 caractérisé en ce que les groupements R_6 et R_7 sont identiques ou différents et représentent chacun des

chaînes aliphatiques saturées ou non, linéaires ou ramifiées, éventuellement fluorées, contenant 10 à 22 atomes de carbone.

6. Agent de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 1 caractérisé en ce que les groupements R_6 et R_7 sont identiques ou différents et représentent chacun des
5 chaînes aliphatiques saturées ou non, linéaires ou ramifiées, éventuellement fluorées, et contenant 12, 14, 16, 17, 18, ou 19 atomes de carbone.

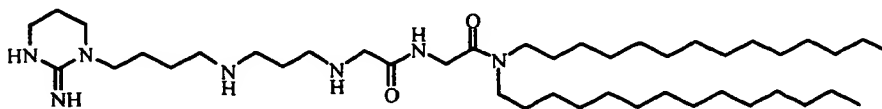
7. Agent de transfert d'acides nucléiques selon les revendications 1 et 5 caractérisé en ce que le dérivé de stéroïde est choisi parmi le cholestérol, le cholestanol, le 3- α -5-cyclo-5- α -cholestan-6- β -ol, l'acide cholique, le cholestérylformiate, le
10 cholestanylformiate, le 3 α ,5-cyclo-5 α -cholestan-6 β -yl formiate, la cholestérylamine, la
6-(1,5-diméthylhexyl)-3a,5a-diméthyl-hexadécahydrocyclopenta[a]cyclopropa[2,3]cyclopenta[1,2-f]naphta-lèn-10-ylamine, ou la cholestanylamine.

8. Les agents de transfert d'acides nucléiques selon la revendication 1 de formules :

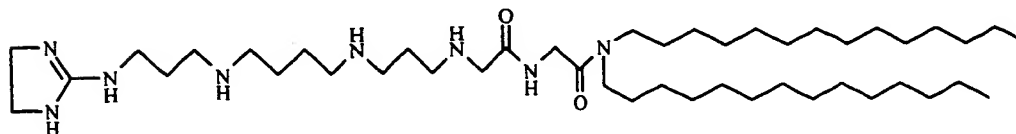


1

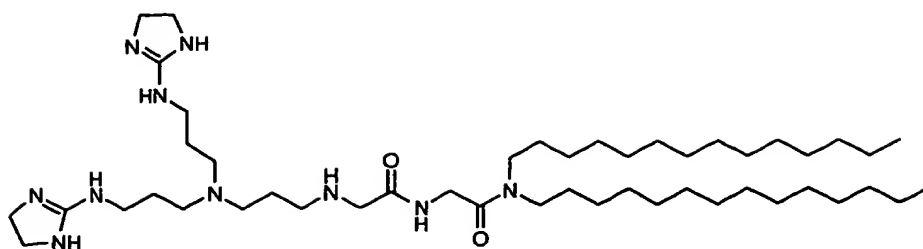
15



2



3



4

9. Procédé de préparation des agents de transfert d'acides nucléiques selon les revendications 1 à 8 caractérisé en ce que l'on effectue la synthèse des briques portant la/les fonctions cycloamidine puis l'on greffe ces briques sur des lipides équipés de répartiteurs.
10. Procédé de préparation des agents de transfert d'acides nucléiques selon les revendications 1 à 8 caractérisé en ce que l'on effectue la synthèse des lipopolyamines puis l'on effectue la cyclisation en tête cycloamidine.
11. Composition caractérisée en ce qu'elle comprend un agent de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 8 et un acide nucléique.
12. Composition selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un ou plusieurs adjuvants.
13. Composition selon la revendication 12 caractérisée en ce que l'adjuvant est un ou plusieurs lipides neutres.
14. Composition selon les revendications 12 et 13 caractérisée en ce que les lipides neutres sont des lipides à deux chaînes grasses.
15. Composition selon les revendications 12 à 14 caractérisée en ce que les lipides neutres sont des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologique, choisis par exemple parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoylpalmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi

que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérebrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

5 16. Composition selon la revendication 12 caractérisée en ce que l'adjuvant est un composé intervenant directement ou non au niveau de la condensation de l'acide nucléique.

10 17. Composition selon la revendication 16 caractérisée en ce que l'adjuvant dérive en tout ou partie d'une protamine, d'une histone, ou d'une nucléoline et/ou de l'un de leurs dérivés, ou bien est constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10, et pouvant être répétés de manière continue ou non.

15 18. Composition selon les revendications 11 à 17 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un ou plusieurs agents de surface non-ionique(s) en quantité suffisante pour stabiliser la taille des particules de complexes nucléolipidiques.

19. Composition selon les revendications 11 à 18 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.

20 20. Composition selon les revendications 11 à 18 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.

21. Utilisation d'un agent de transfert selon l'une des revendications 1 à 8 pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules.

25 22. Utilisation d'un agent de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 8 pour le transfert d'acides nucléiques dans les cellules par voie intramusculaire.

23. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

5 (1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un agent de transfert tel que défini dans les revendications 1 à 8 pour former un complexe, et

(2) la mise en contact des cellules avec le complexe formé en (1).

24. Méthode de transfert d'acides nucléiques dans les cellules selon la revendication 23 caractérisée en ce que ledit acide nucléique et/ou ledit agent de transfert sont préalablement mélangés à un ou plusieurs adjuvants.

ORIGINAL

que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois, les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérebrosides (tels que notamment les galactocérebrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

- 5 16. Composition selon la revendication 12 caractérisée en ce que l'adjuvant est un composé intervenant directement ou non au niveau de la condensation de l'acide nucléique.

- 10 17. Composition selon la revendication 16 caractérisée en ce que l'adjuvant dérive en tout ou partie d'une protamine, d'une histone, ou d'une nucléoline et/ou de l'un de leurs dérivés, ou bien est constitué, en tout ou partie, de motifs peptidiques (KTPKKAKKP) et/ou (ATPAKKAA), le nombre des motifs pouvant varier entre 2 et 10, et pouvant être répétés de manière continue ou non.

- 15 18. Composition selon les revendications 11 à 17 caractérisée en ce qu'elle contient en outre un ou plusieurs agents de surface non-ionique(s) en quantité suffisante pour stabiliser la taille des particules de complexes nucléolipidiques.

19. Composition selon les revendications 11 à 18 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.

- 20 20. Composition selon les revendications 11 à 18 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.

21. Utilisation d'un agent de transfert selon l'une des revendications 1 à 8 pour le transfert *in vitro* ou *ex vivo* d'acides nucléiques dans les cellules.

- 25 22. Utilisation d'un agent de transfert d'acides nucléiques selon l'une des revendications 1 à 8 pour le transfert *in vitro* ou *ex vivo* d'acides nucléiques dans les cellules par voie intramusculaire.

23. Méthode de transfert *in vitro* ou *ex vivo* d'acides nucléiques dans les cellules caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

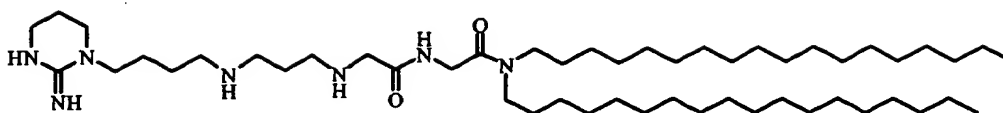
5 (1) la mise en contact de l'acide nucléique avec un agent de transfert tel que défini dans les revendications 1 à 8 pour former un complexe, et

(2) la mise en contact des cellules avec le complexe formé en (1).

24. Méthode de transfert *in vitro* ou *ex vivo* d'acides nucléiques dans les cellules selon la revendication 23 caractérisée en ce que ledit acide nucléique et/ou ledit agent de transfert sont préalablement mélangés à un ou plusieurs adjuvants.

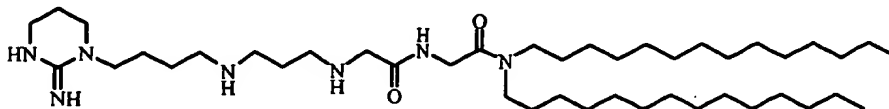


FIG. 1/8



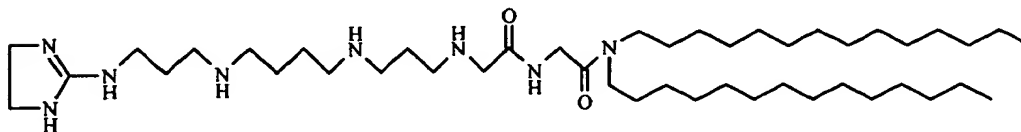
1

N-dioctadécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]propylamino}-acétamide



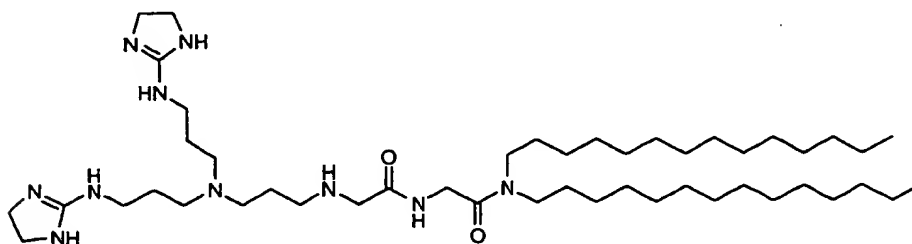
2

N-ditétradécylcarbamoylméthyl-2-{3-[4-(2-imino-tétrahydro-pyrimidin-1-yl)-butylamino]propylamino}-acétamide



3

2-(3-{4-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propylamino]-butylamino}-N-ditétradécylcarbamoylméthyl)-acétamide



4

2-(3-{bis-[3-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-ylamino)-propyl]-amino}-N-ditétradécylcarbamoylméthyl)-acétamide.

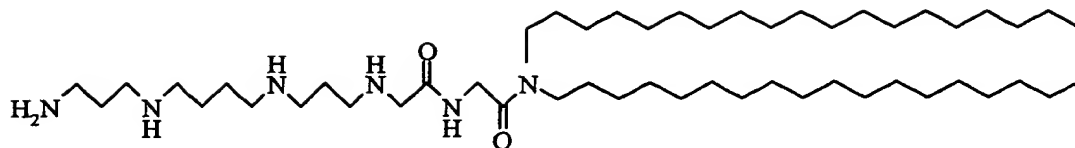
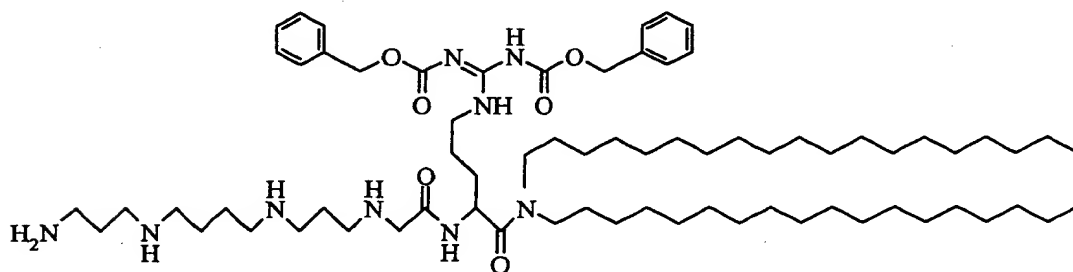
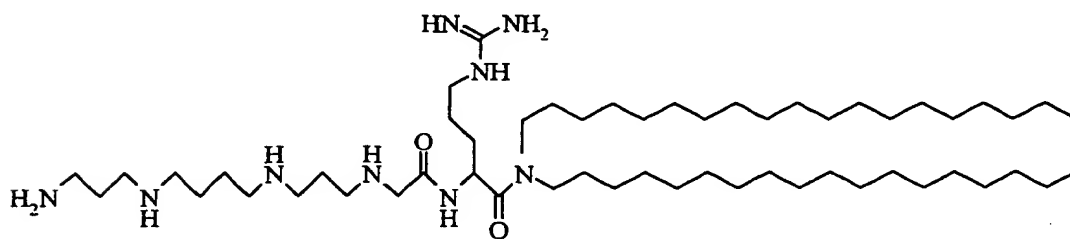
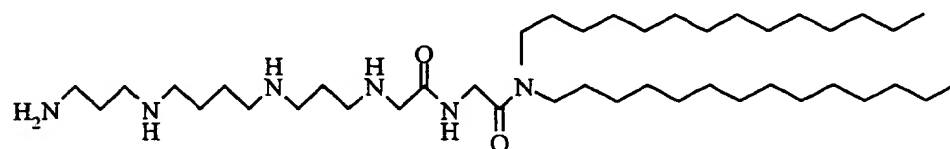
FIG. 2/8**RPR 120535****RPR 121650****RPR 120531****RPR 122766**

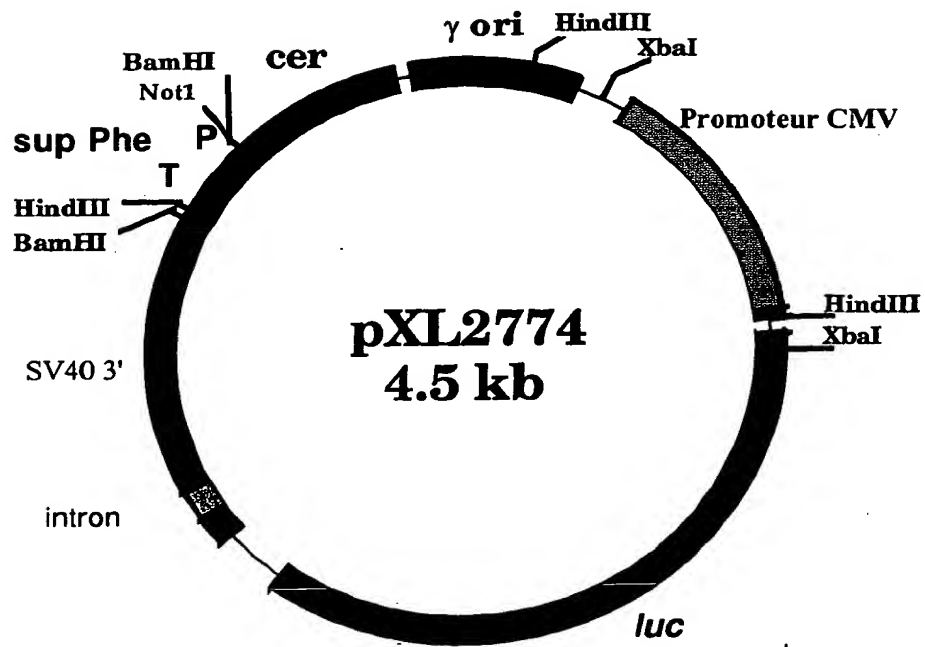
FIG. 3/8

FIG. 4/8

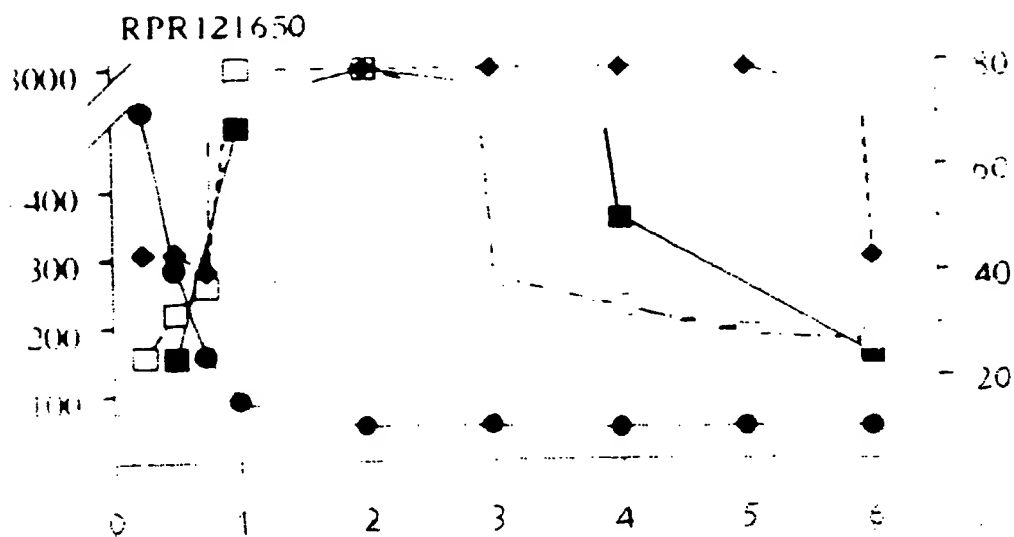
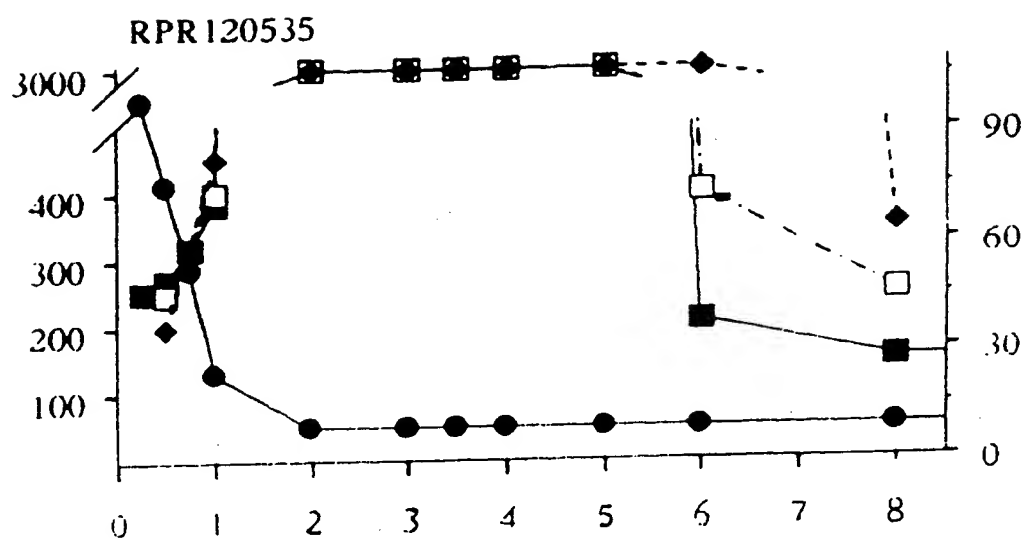
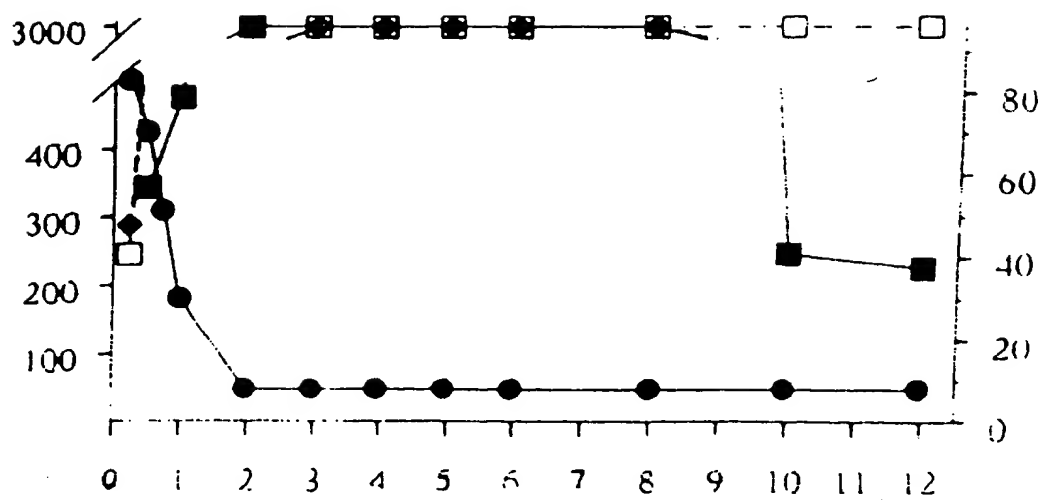


FIG. 5/8



Composé 1

FIG. 6/8

Luciferase (pg/puit)

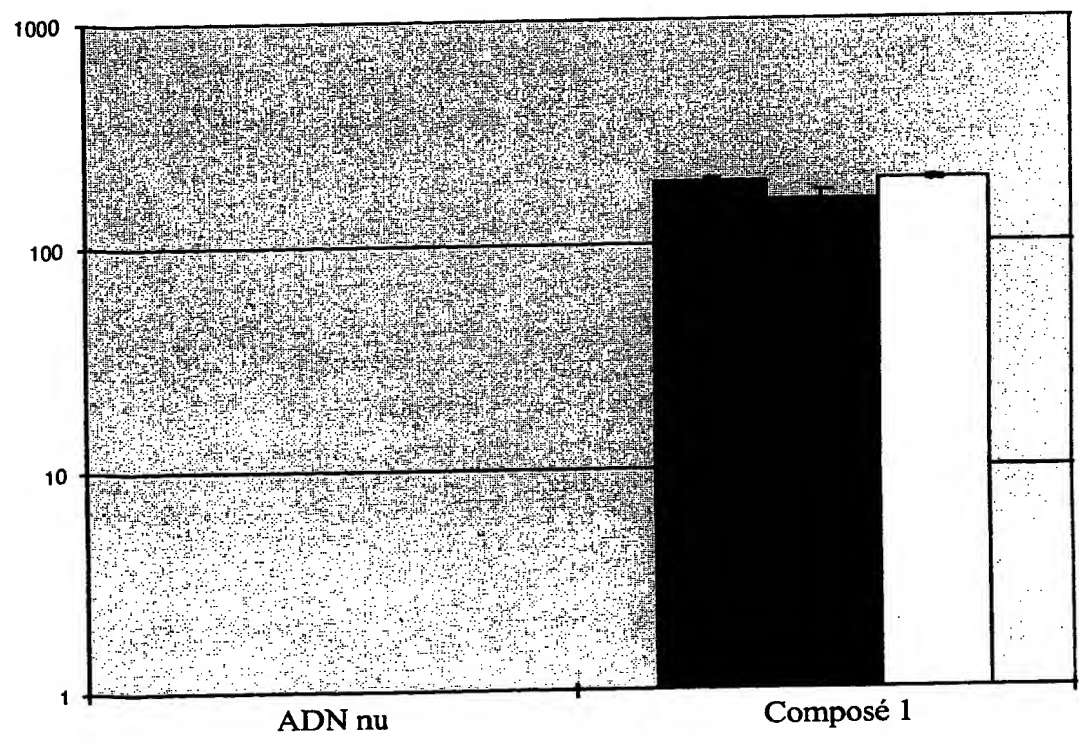


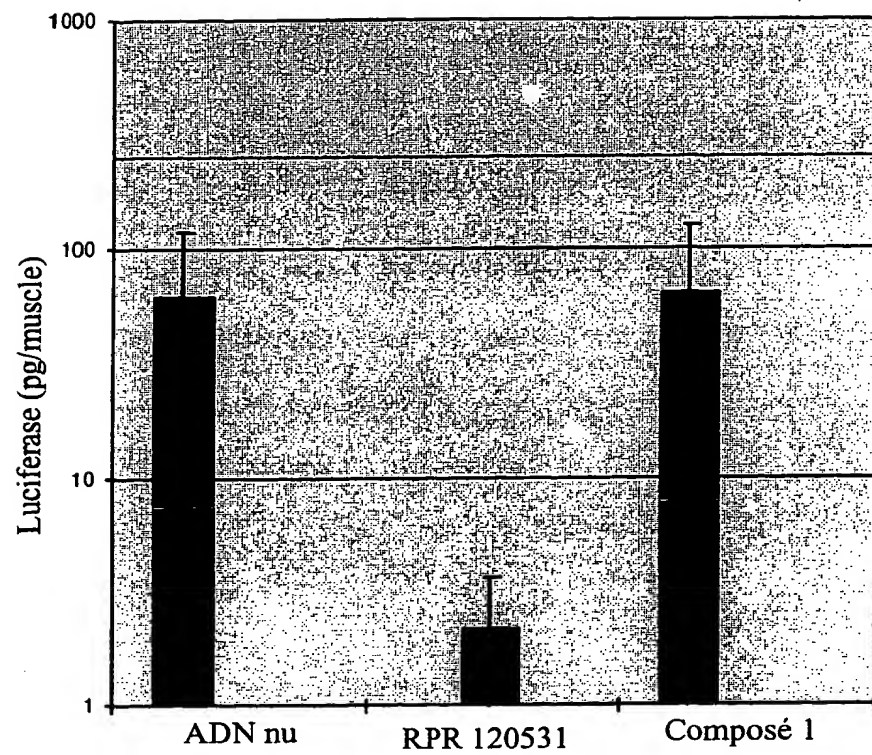
FIG. 7/8

FIG. 8/8